

Etablierung und Charakterisierung von biodegradierbaren Calciumphosphat Nanopartikeln zur Induktion potenter anti- viraler T-Zellantworten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Torben Knuschke
aus Bochum

Dezember 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Astrid M. Westendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der Disputation: 12.02.2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1.1	Die Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems.....	1
1.1.1.2	Mustererkennende Rezeptoren	4
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	7
1.1.2.1	Die T-Zell vermittelte adaptive Immunantwort	8
1.2	Pathogen-spezifische Induktion einer Immunantwort mit Hilfe von verschiedenen Impfstoffen	10
1.3	Influenzaviren.....	14
1.3.1	Struktur und Replikation von Influenza A Viren	15
1.3.2	Immunantwort bei Influenza A Infektion.....	17
1.4	Retroviren	19
1.4.1	Struktur und Replikation von Retroviren	19
1.4.2	Friend Virus als Tiermodell für retrovirale Infektionen	22
1.4.3	Immunantwort gegen eine Friend Virus Infektion	23
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen	25
2.2	TLR-Liganden und Peptide.....	26
2.3	Versuchstiere	26
2.3.1	BALB/c Mäuse	27
2.3.1.1	CL4-TCR Maus	27
2.3.1.2	TCR-HA Maus.....	27
2.3.2	CB6F1 Mäuse	27
2.3.3	C57BL/6 Mäuse	27
2.3.3.1	TLR3 ^{-/-} 7 ^{-/-} 9 ^{-/-} Knockout Mäuse.....	27
2.4	Identifizierung transgener Mäuse	28
2.5	Herstellung von Calciumphosphat Nanopartikeln	29
2.5.1	Funktionalisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln mit TLR-Liganden und viralen Antigen	29

2.5.2	Funktionalisierung von CaP Nanopartikeln mit TLR-Liganden, viralen Antigen und Zell-spezifischen Antikörpern.....	30
2.6	Tierexperimentelle Methoden	32
2.6.1	Narkotisierung von Mäusen	32
2.6.2	Blutentnahme	32
2.6.3	Organentnahme	32
2.6.4	Immunisierungen	33
2.6.4.1	Immunisierung gegen Influenza Virus Infektion.....	33
2.6.4.2	Immunisierung gegen akute Friend Virus Infektion	33
2.6.4.3	Belastungsinfektionen.....	33
2.6.4.3.1	Influenza Virus Infektion.....	33
2.6.4.3.2	Friend Virus Infektion	34
2.6.4.4	Palpation der Milz	34
2.7	Zellbiologische Methoden	34
2.7.1	Zellzahlbestimmung	34
2.7.2	Zellkultur	34
2.7.2.1	Kultivierung von <i>NLDC145</i> - und <i>G117</i> -Zellen	34
2.7.2.1.1	Antikörperaufreinigung aus Hybridomaüberständen.....	35
2.7.2.2	Kultivierung von <i>MDCK</i> -Zellen.....	35
2.7.2.3	Kultivierung von <i>Mus dunni</i> -Zellen.....	36
2.7.3	Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	36
2.7.3.1	Milz.....	36
2.7.3.2	Lymphknoten	36
2.7.4	Isolierung von CD4 ⁺ oder CD8 ⁺ T-Zellen.....	36
2.7.5	Isolierung von Dendritischen Zellen.....	37
2.7.6	IFN- γ ELISpot Assay.....	37
2.7.7	Durchflusszytometrie	37
2.7.7.1	Färbung gegen Oberflächenproteine.....	38
2.7.7.2	Multimer Färbung.....	38
2.7.7.3	Intrazelluläre Färbung von Foxp3 und Granzym B.....	39
2.7.8	„Cell Proliferation Dye“ eFluor670®-Markierung von Lymphozyten	39
2.7.9	Proliferationstests	39
2.7.9.1	Proliferationstest <i>in vitro</i>	39
2.7.9.2	Proliferationstest <i>in vivo</i>	40
2.7.10	Bestimmung von sezernierten Zytokinen.....	40
2.7.11	Aufnahmestudien von funktionalisierten CaP Nanopartikeln	41
2.7.11.1	Aufnahmenachweis <i>in vitro</i>	41
2.7.11.2	Aufnahmenachweis <i>in vivo</i>	42
2.7.12	Bestimmung der Viruslast.....	42
2.7.12.1	Bestimmung des Influenza Virustiters in der Lunge mittels	42
	Plaque Assay	42
2.7.12.2	Bestimmung infektiöser Zellen nach Friend Virus Infektion im	43
	IC-Assay.....	43

2.7.12.3	Bestimmung der Plasma-Virämie	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Herstellung und Funktionalisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems	45
3.2	<i>In vitro</i> Aktivierung des Immunsystems	46
3.2.1	Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch DCs	46
3.2.2	Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellantworten durch DCs nach Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel	52
3.3	<i>In vivo</i> Aktivierung des Immunsystems	55
3.3.1	Aufnahme von CaP Nanopartikeln über verschiedene Applikationswege <i>in vivo</i>	55
3.3.2	<i>In vivo</i> Induktion Ag-spezifischer T-Zellantworten	57
3.3.3	Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion	58
3.3.3.1	IP Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion	59
3.3.3.2	Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion nach IN Applikation ...	61
3.3.4	Immunisierung gegen eine Retrovirusinfektion	64
3.3.5	Therapeutische Immunisierung gegen eine chronische Retrovirus Infektion	70
3.4	Spezifisches Adressieren von DCs mit CaP Nanopartikeln	74
3.4.1	<i>In vitro</i> Aufnahme von α CD11c funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch DCs	74
3.4.2	<i>In vivo</i> Aufnahme von α CD11c Antikörper funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch DCs	76
3.4.3	Induktion einer Influenza Virus-spezifischen T-Zellantwort mit α DEC205-funktionalisierten CaP Nanopartikeln	77
4	DISKUSSION	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LITERATUR	96
7	ANHANG	111
7.1	Abkürzungsverzeichnis	111
7.2	Abbildungsverzeichnis	115
7.3	Tabellenverzeichnis	117
	Danksagung	118

Publikationen und Tagungsbeiträge	119
Lebenslauf	123
Erklärungen	125

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist für die Bekämpfung von in einen Organismus eingedrungenen Fremdorganismen oder -strukturen verantwortlich, auch Pathogene genannt. Es ist hoch komplex und lässt sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem einteilen. Jeder Teil besitzt für die Erkennung und Abwehr von Pathogenen hoch spezialisierte Zelltypen. Das Zusammenwirken dieser beiden Teile ermöglicht schließlich den Aufbau einer spezifischen Immunantwort auf das eingedrungene Pathogen. Gleichzeitig entsteht ein immunologisches Gedächtnis, so dass bei erneutem Kontakt mit diesem Pathogen eine schnellere gezielte Immunabwehr erfolgen kann.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist die erste Barriere der Immunabwehr gegenüber eingedrungenen Pathogenen, wie zum Beispiel Viren oder Bakterien. Sie dient der ersten Erkennung dieser Fremdkörper und deren unspezifischer Abwehr (Muller *et al.* 2008), (Akira *et al.* 2006). Diese geschieht durch verschiedene Zelltypen, ausgestattet mit sogenannten Mustererkennenden Rezeptoren (pattern recognition receptor, PRR) und unspezifischen Abwehrmechanismen (Akira *et al.* 2006).

1.1.1.1 Die Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems

Zu den verschiedenen Zelltypen des angeborenen Immunsystems zählen hauptsächlich Immunzellen wie die eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Dendritische Zellen (DC), aber auch nicht professionelle Immunzellen wie zum Beispiel Epithelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten, die durch ihre PRR Expression auch ihre Funktion bei der Erkennung von einwandernden Pathogenen haben (Muller *et al.*, 2008; Takeuchi and Akira 2010).

Makrophagen und Dendritische Zellen sind die professionellsten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des angeborenen Immunsystems, wobei den DCs eine besonders wichtige Rolle in der Verbindung zwischen angeborener und

adaptiver Immunreaktion zugesprochen wird (Steinman and Hemmi 2006). Die APCs verfügen über endozytotische Eigenschaften, das heißt sie können ein Pathogen oder dessen Bestandteile, die vom Immunsystem erkannt werden können (Antigene), durch den Prozess der rezeptorvermittelten oder -unvermittelten Phagozytose oder Pinozytose internalisieren und abtöten (Savina and Amigorena 2007). Bei der Phagozytose wird das Pathogen durch die Plasmamembran der entsprechenden Zelle umschlossen und als sogenanntes Endosom ins Zellinnere geführt. Durch Verschmelzen mit den hydrolasehaltigen Lysosomen entsteht ein saures Milieu im Inneren des Endolysosoms, so dass viele Pathogene abgetötet und Proteasen aktiviert werden können (Aderem and Underhill 1999). Pathogene Bestandteile werden durch verschiedene Enzyme verarbeitet und in Form von kleinen Peptidfragmenten (Epitope) auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen („major histocompatibility complex“, MHC) der Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert, um von Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt zu werden (Burgdorf and Kurts 2008). Bei dem Vorgang der Pinozytose, die von DCs durchgeführt wird, werden größere Mengen extrazellulärer Flüssigkeit aus der Umgebung mit all ihren Bestandteilen mit der Plasmamembran umschlossen, internalisiert und wie bei der Phagozytose weiter verarbeitet (Swanson and Watts 1995). Liegen pathogene Bestandteile intrazellulär vor, werden die Antigene nach Prozessierung durch das Proteasom und Transport über die Proteine TAP („Transporter associated with antigen processing“) und TAP2 zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) auf MHCI Molekülen gebunden und schließlich ebenfalls an der Zelloberfläche präsentiert (Williams *et al.* 2002). Durch den sogenannten Prozess der Kreuzpräsentation („cross presentation“) können dagegen exogen aufgenommene lösliche Antigene oder partikuläre Antigene sowie partikuläre Antigenträger auch auf MHCI Molekülen präsentiert werden und $CD8^+$ T-Zellantworten gegen intrazelluläre Pathogene oder Tumorgewebe initiiert werden, ohne das DCs selbst infiziert sind (Heath *et al.* 2004; Kurts *et al.* 2010). Der Prozess der Kreuzpräsentation kann vor allem von DCs aber auch von einigen Makrophagen (Pozzi *et al.* 2005), Endothelzellen (Limmer *et al.* 2000) sowie B-Zellen (Ke and Kapp 1996) durchgeführt werden. Wichtig ist hierbei, dass nach Phagozytose des Antigens das Phagolysosom durch die NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidase NOX2 alkalisiert wird, um die Aktivierung von Proteasen und

damit den frühen Abbau der Antigene zu verhindern (Savina *et al.* 2006). Nachdem die Antigene für die MHCI-Präsentation prozessiert werden konnten, kommt es zur Azidifikation der Phagolysosomen, so dass partikuläre Strukturen auch für die MHCII Präsentation verarbeitet werden können (Villadangos *et al.* 2000). Abbildung 1.1 fasst die Prozessierung mit anschließender Präsentation exogener sowie endogener Antigene schematisch zusammen.

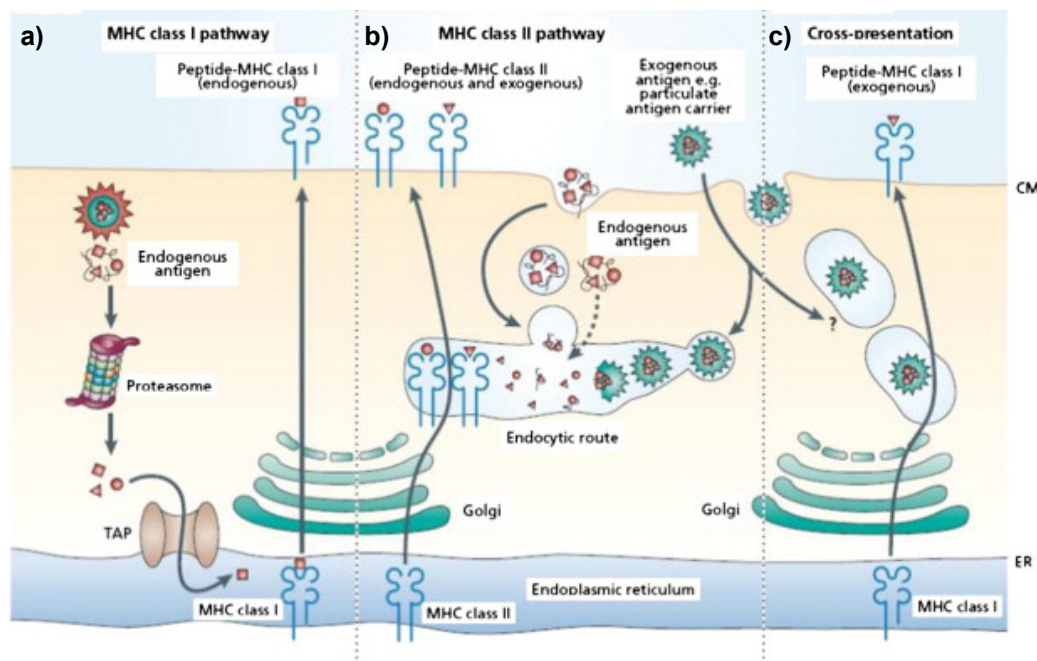


Abbildung 1.1: Exogene und endogene Mechanismen zur Aufnahme und Präsentation von Antigenen (verändert nach Joshi *et al.* 2012). Ort der Aufnahme eines Antigens entscheidet über die Präsentation eines Antigens auf MHCI oder MHCII-Molekülen. **a)** Liegt ein Antigen endogen vor, wird es über das Proteasom prozessiert und via TAP Transportermolekülen zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) geführt, wo es mit MHCI Molekülen assoziiert wird, die anschließend über den Golgi Apparat auf der Zelloberfläche platziert werden. **b)** Wird ein Antigen dagegen exogen aufgenommen, so wird es nach Verschmelzung des Phagosoms mit Protease-haltigen Lysosomen prozessiert und mittels MHCII-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. **c)** Besitzt eine Zelle die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation, so können exogen aufgenommene Antigene auch auf MHCI-Molekülen präsentiert werden, wenn die Azidifikation des Phagolysosoms unterbunden wird.

DCs werden in der Maus in zwei generelle Typen unterschieden: konventionelle (cDCs) und plasmazytoide (pDCs). Sie exprimieren alle das Differenzierungsmerkmal (cluster of differentiation, CD) CD11c. Unter den cDCs finden sich DCs, die zusätzlich das CD8 Molekül tragen (Belz *et al.* 2004; O'Keeffe *et al.* 2002; Steinman and Inaba 1999). CD8⁺ DCs gelten als die effektivsten kreuzpräsentierenden Zellen (Dudziak *et al.* 2007) und werden außerdem mit T-Helferzellantworten vom Typ I assoziiert (Maldonado-Lopez *et al.* 1999).

Der Hauptaufgabenbereich der cDCs besteht in der Erkennung und Aufnahme von Pathogenen in der Peripherie und der Präsentation ihrer Antigene nach Migration in lymphatisches Gewebe, um eine T-Zell vermittelte Immunantwort zu induzieren. Dabei produzieren sie zusätzlich inflammatorische Zytokine. Bei Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine, die der interzellulären Kommunikation dienen und bei Bindung an den spezifischen Rezeptor durch intrazelluläre Signalwege die Regulierung von Genexpressionen einer Zelle beeinflussen können. DCs gelten daher als wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. pDCs sind die Hauptproduzenten der antiviralen Interferone (IFN) und wirken nach Aufnahme und Erkennung hauptsächlich durch die Sekretion von Zytokinen (Shortman and Liu 2002).

Die Eigenschaften einer DC lassen sich dabei von ihrem Reifestatus ableiten. Unreife DCs sind vermehrt in der Peripherie eines Organismus lokalisiert, wo sie mit eingedrungenen Pathogenen oder infizierten Zellen in Kontakt treten können und durch die Erkennung dieser Fremdstrukturen reifen. Die Erkennung erfolgt unter anderem durch PRRs, die auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder im Endosom vertreten sind (Takeuchi and Akira 2010). Reife DCs wandern in lymphatische Organe ein, um dort den T-Lymphozyten die Antigene des Pathogens zu präsentieren. Durch den Reifungsprozess wird die Expression für die T-Zell Interaktion wichtiger kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD80, CD86, CD40) und der MHCII Moleküle hoch reguliert (Banchereau *et al.* 2000). Gleichzeitig sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin 12 (IL-12), IL-2 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die eine Immunreaktion weiter voran treiben.

1.1.1.2 Mustererkennende Rezeptoren

Die Erkennung von aufgenommenen Pathogenen vollzieht sich durch die Mustererkennenden Rezeptoren. Dabei erkennt jeder Rezeptor spezifische Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern, PAMP) (Akira *et al.* 2006; Beutler 2003). Eine Erkennung eines PAMP durch einen PRR führt zur Aktivierung und Produktion verschiedener Chemokine sowie Zytokine durch die entsprechende Zelle. Zu diesen PRRs zählen die RIG-I (retinoic acid inducible gene I)-ähnlichen RNA Helikasen (RLH), NOD (nucleotide binding

oligomerization domain)-ähnlichen Rezeptoren (NLR) und Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like receptor, TLR). TLRs sind Typ I Transmembranproteine, die sich aus drei Hauptdomänen zusammensetzen und durch Leucin-reiche Wiederholungsregionen („leucine rich repeats“, LRR) in der Ektodomäne charakterisieren. LRRs vermitteln die Erkennung von PAMPs. Von diesen TLRs sind bislang mehr als 12 verschiedene bekannt, von denen lediglich die ersten 10 auch im Menschen nachgewiesen werden konnten (Akira *et al.* 2006; Takeuchi and Akira 2010). In der Maus sind bislang 12 verschiedene TLRs bekannt (TLR 1-9, 11-13), wobei TLR10 hier durch eine endogene Retrovirus Insertion funktionslos ist. Jeder TLR erkennt dabei ein unterschiedliches PAMP, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Die Lokalisation der jeweiligen TLRs kann sich ebenfalls unterscheiden. Die Bindung eines entsprechenden Musters (Ligand) an den jeweiligen TLR löst eine Signalkaskade aus, welche ausgehend von den Adaptormolekülen MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene) oder TRIF (Toll-Interleukin 1-Resistance (TIR) domain containing adaptor inducing IFN- β) weitergeleitet wird und letztendlich der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells) aktiviert wird. Die darauffolgende Translokation in den Zellkern induziert die weitere Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine.

TLR3 und TLR9 sind beide in intrazellulären Vesikeln wie Endosomen, Lysosomen oder dem ER lokalisiert und erkennen Nukleinsäuren von Viren und Bakterien. Während TLR9 unmethylierte 2'Dioxyribo Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) DNA-Motive bindet und die ausgelöste Signalkaskade durch das Adaptormolekül MyD88 vermittelt wird (Hemmi *et al.* 2000), erkennt TLR3 doppelsträngige RNA beziehungsweise das synthetische Äquivalent poly(I:C) (polyinosinic polycytidylic acid), und verwendet das Adaptormolekül TRIF. Die Bindung des Liganden an TLR9 führt zu der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-12 und IL-6. Für TLR3 ist außerdem die Expression der Interferone vom Typ I (IFN I) beschrieben (Meylan *et al.* 2006; Robbins and Rossi 2005). Beide Zytokinexpressionsmuster scheinen u.a. den Prozess der Kreuzpräsentation positiv zu beeinflussen (de *et al.* 2011; Schulz *et al.* 2005). Interessanterweise wurden pDCs mit der Produktion von IFN- α (Typ I IFN) bei Infektion mit DNA Viren wie dem murinen Cytomegalie Virus (MCMV) assoziiert, so dass sie als Sensoren für virale Infektionen dienen könnten (Krug *et al.* 2004).

Tabelle 1.1: Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.

Rezeptor	Ligand	Organismus	Lokalisation
TLR1	Triacyl-Lipopeptid	Bakterien	Zelloberfläche
TLR2	Lipopeptide/Lipoproteine Peptidoglykan Lipoteichonsäure Glycosylphosphatidylinositol Zymosan	Bakterien Bakterien gram-pos. Bakterien <i>T. cruzi</i> , <i>P. falciparum</i> Pilze	Zelloberfläche
TLR3	dsRNA Poly (I:C)	Virus Synth. Äquivalent	Endosomen
TLR4	LPS Taxol Peptidoglykan Hitzeschockproteine Fibrinogen	gram-neg. Bakterien Pflanzen Mykobakterien Wirt Wirt	Zelloberfläche
TLR5	Flagellin	Bakterien	Zelloberfläche
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	Mykobakterien	Zelloberfläche
TLR7	ssRNA Imidazoquinoline Loxoribine	Virus Synth. Äquivalent Synth. Äquivalent	Endosomen
TLR8	ssRNA Imidazoquinoline	Virus Synth. Äquivalent	Endosomen
TLR9	CpG-DNA	Bakterien Viren synthetisch	Endosomen
TLR10	unbekannt	unbekannt	unbekannt
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle	<i>T. gondii</i>	Zelloberfläche
TLR12	unbekannt	unbekannt	unbekannt
TLR13	rRNA unbekannt	Bakterien Virus	Endosomen
TLR15	unbekannt	unbekannt	unbekannt

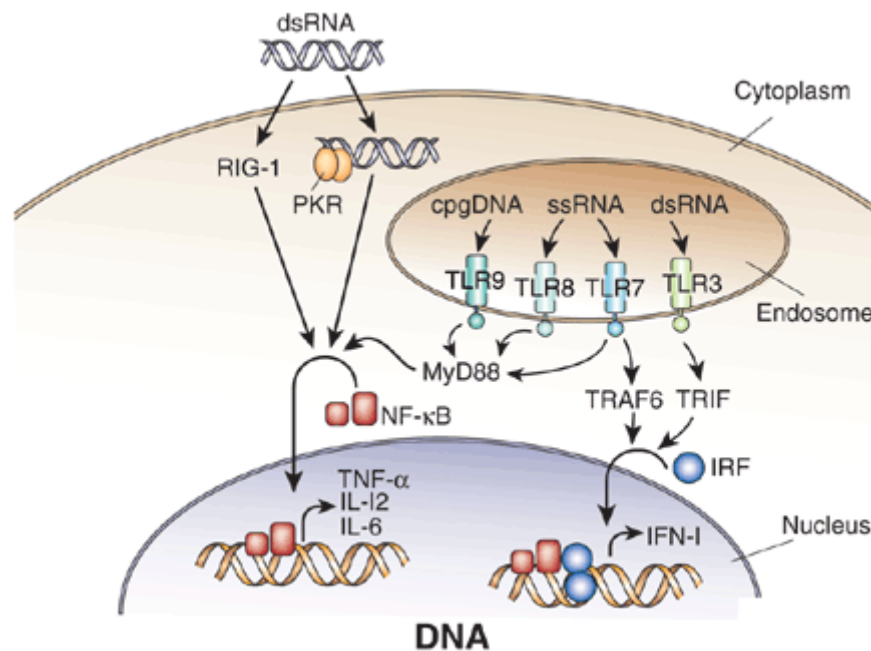


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Lokalisation und Signalwege der verschiedenen Toll-like Rezeptoren (Robbins and Rossi 2005). Rezeptoren der TLR Familie erkennen spezifische PAMPs. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 sind endosomal lokalisiert. Alle TLRs außer TLR3 initiieren eine Signalkaskade über das Adaptormolekül MyD88 um eine Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB zu induzieren. TLR3 und 7 induzieren eine Translokation von IRF. Am Ende der Signalkaskade steht die Expression inflammatorischer Gene.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Nach dem ersten Kontakt und der Erkennung durch das angeborene Immunsystem wird mit Hilfe von APCs eine adaptive Immunantwort induziert. Die adaptive Immunantwort passt sich dabei spezifisch an das entsprechende Pathogen an und setzt sich aus den T- und B-Lymphozyten zusammen. Lymphozyten zirkulieren im Blut und den Lymphen. Man findet sie in großer Anzahl in lymphatischen Geweben und Organen. Dabei unterscheidet man zwischen den primären und den sekundären Organen. Während es in den primären lymphatischen Organen zur Bildung von Lymphozyten kommt, stellen die sekundären lymphatischen Organe das Zielorgan von gereiften, naiven Lymphozyten dar, der Ausgangspunkt einer Immunreaktion.

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten stammen von der hämatopoietischen Stammzelle des Knochenmarks ab. Während T-Lymphozyten ihre weitere Reifung nach Migration in den Thymus erfahren, reifen B-Lymphozyten direkt im Knochenmark. Nach der Reifung und Abwanderung ins Blut, dem Lymphsystem sowie sekundären lymphatischen Organen, sind B-Lymphozyten für die

kontrollierte humorale Immunantwort zuständig, die von den Antikörpermolekülen (Immunglobulinen, Ig) geprägt ist (Graf 2008). Die Reifung wird durch die Erkennung eines Fremdartigens ausgelöst und kann die Hilfe von T-Helferzellen (T_H) benötigen (McHeyzer-Williams *et al.* 2006). Nach Aktivierung differenziert sich die naive B-Zelle weiter in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle. Durch die Möglichkeit der somatischen Hypermutation generieren B-Zellen passend zum Antigen hochaffine Immunglobuline (Li *et al.* 2004). Sezernierte Antikörper können dabei verschiedene Effekte erzeugen. Während neutralisierende Antikörper nach Bindung an das Pathogen dessen Eintritt in Zielzellen verhindern, können opsonisierende Antikörper die Phagozytose durch Makrophagen oder Granulozyten steigern. Möglich ist auch eine Aktivierung des Komplementsystems durch Antikörper.

Nach ihrer Reifung im Thymus migrieren T-Lymphozyten ebenfalls ins Blut, die Lymphe und in sekundäre lymphatische Organe. Anhand der Expression ihrer Oberflächenmoleküle, unterscheidet man zwei verschiedene Typen von T-Zellen. T-Helferzellen exprimieren das CD4 Molekül, zytotoxische T-Zellen (CTL) das CD8 Molekül. Beide Zelltypen besitzen unterschiedliche Effektoreigenschaften.

1.1.2.1 Die T-Zell vermittelte adaptive Immunantwort

Naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen erkennen mithilfe ihres T-Zellrezeptors (TCR) ihr spezifisches Antigen, das auf MHC Molekülen antigenpräsentierender Zellen präsentiert wird. Dabei erkennen $CD4^+$ T-Helferzellen nur die Antigene, die mittels MHCII Molekül präsentiert werden (Konig *et al.* 1992). Die Erkennung eines passenden Antigens erfolgt über den spezifischen T-Zellrezeptor und den Co-Rezeptor CD4. Zusammen mit weiteren Signalen, vermittelt durch kostimulatorische Moleküle, wird die T-Zelle aktiviert, vermehrt sich und differenziert in eine Effektorzelle. Hier unterscheidet man weiter in verschiedene immunologische Funktionen. Die Hauptsubtypen der $CD4^+$ Effektorzellen sind T-Helferzellen des Typs 1 (T_H1), T_H2 , T_H17 , folliculäre T-Helferzellen (T_{FH}) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Seder and Paul 1994).

$CD4^+$ Effektorzellen zeichnen sich durch die Sekretion inflammatorischer und antiviraler Zytokine aus. T_H1 -Zellen sezernieren zum Beispiel IL-2, IFN- γ oder TNF- α und tragen dadurch zur Aktivierung von Makrophagen und $CD8^+$

zytotoxischen T-Zellen bei, wodurch sie die zelluläre Immunantwort unterstützen (Keene and Forman 1982). Sie besitzen zudem zellvermittelte zytotoxische Fähigkeiten mit denen sie infizierte Zellen abtöten können (Brown *et al.* 2006). T_H2-Zellen dagegen sezernieren Zytokine wie IL-4, IL-5 sowie IL-10 und unterstützen so die humorale Immunantwort bei gleichzeitiger Inhibierung der T_H1 und Makrophagen Aktivität (Stevens *et al.* 1988).

Eine T_H1 vermittelte Immunantwort tritt besonders bei intrazellulären Pathogenen wie Viren oder intrazellulären Bakterien auf, wohingegen sich eine T_H2 vermittelte Immunantwort besonders bei extrazellulären Erregern ausprägt wie Würmern oder extrazellulären Bakterien (Abbas *et al.* 1996; Mosmann and Coffman 1989). Dabei sind besonders die Zytokine IL-12 (Induktion einer T_H1 vermittelten Immunantwort) und IL-4 (Induktion einer T_H2 vermittelten Immunantwort) an T_H-Zell-Differenzierungsprozessen beteiligt.

T_H17-Zellen haben durch die Sekretion der Zytokine IL-17, IL-22, TNF- α und dem Chemokin CXCL1 besonders Einfluss auf die Rekrutierung von Neutrophilen zur Infektionsstelle sowie der Produktion antimikrobieller Proteine (Weaver *et al.* 2006).

Eine besondere Rolle kommt den T_{regs} zu, die durch die Ausschüttung der suppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β einen hemmenden Einfluss auf eine Immunreaktion haben können. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T_{regs} wurden bisher beschrieben (Sakaguchi *et al.* 2008).

Obwohl CD4⁺ T-Zellen ebenfalls zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben werden (Marshall and Swain 2011), ist dies die Haupteigenschaft von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL). Haben sie das passende Antigen auf einem MHC I Molekül einer infizierten Zelle mittels T-Zellrezeptor erkannt, erfolgt die Induktion von Apoptose durch das Fas-Molekül (Nagata 1996). Durch die Fas-Fas-Liganden Bindung aktivierten Nukleasen können neben der zielzelleigenen DNA auch virale DNA abbauen, was den Replikationszyklus eines Virus unterbricht. Ein anderer Mechanismus, mit dem CTLs Zielzellen abtöten können, ist die Freisetzung von speziellen zytotoxischen Granula (Russell and Ley 2002). Dabei handelt es sich um modifizierte Lysosomen, die zytotoxische Effektorproteine wie Perforine und Granzyme enthalten. Perforin verursacht die Bildung von Poren in der Zellwand der Zielzelle, so dass Granzyme eintreten können und dort durch Aktivierung von Kaspasen die Apoptose einleiten zu können. Neben der Produktion zytotoxischer

Granula, beherrschen $CD8^+$ T-Zellen auch die Sekretion von $TNF-\alpha$ und dem antiviral wirksamen $IFN-\gamma$. $IFN-\gamma$ bewirkt eine Inhibition der pathogenen Replikation (Gregory and Wing 1993) und führt zudem zu einer gesteigerten Expression der MHC I Moleküle auf infizierten Zellen, wodurch sie leichter zum CTL-Ziel werden (Fruh and Yang 1999). Zusätzlich hat $IFN-\gamma$ Einfluss auf die Apoptose von infizierten Zellen, vermittelt durch die induzierte erhöhte Expression des Fas-Moleküls (Mullbacher *et al.* 2002). Durch die Erkennung von Antigenen auf MHC I Molekülen sind CTLs bei intrazellulären Infektionen mit Viren oder Bakterien von besonderer Wichtigkeit.

1.2 Pathogen-spezifische Induktion einer Immunantwort mit Hilfe von verschiedenen Impfstoffen

Viele Pathogen-induzierte Erkrankungen (Viren, Bakterien, Parasiten, etc.) sind von großer Gefährdung für den Menschen. Gegen viele von ihnen existieren bereits wirksame Impfstoffe. Generell versucht man bei einer Impfstoffentwicklung, das Immunsystem gezielt auf ein potentiell Pathogen vorzubereiten (Markel 2005). Ziel ist es dabei durch Antigen-spezifische Aktivierung des adaptiven Immunsystems einen langanhaltenden immunologischen Schutz aufzubauen. Dieser kann in der Induktion für gegen das jeweilige Pathogen neutralisierender Antikörper und/oder T-Gedächtniszellen liegen. Der Ursprung der Impfung oder Vakzinierung, liegt im Jahr 1796, als Edward Jenner wissentlich Kuhpocken Viren (*Orthopoxvirus vaccinia*) zur Schutzinduktion gegen Pockenerkrankungen beim Menschen nutzte (Coffin *et al.* 1997; Jenner 1789). Seither haben sich das Wissen und die Vakzinierungsmethoden weitreichend verändert, die Methode eines Lebendimpfstoffes wird jedoch teilweise immer noch verwendet. Meist nutzt man hier attenuierte Mikroorganismen, die eine verringerte Pathogenität besitzen und so eine protektive Immunität erzeugen, ohne jedoch die eigentliche Krankheit in der Form auszulösen (Anderson *et al.* 1997). Hier ist es auch möglich auf genetisch veränderte Organismen zurückzugreifen, um die Effektivität der Immunisierung zum Beispiel zu steigern. Der große Vorteil dieser Methode ist zudem, dass viele Virusproteine vorhanden bleiben und der Infektionsprozess des Pathogens erhalten bleiben kann. So kann sowohl eine humorale, als auch eine

zelluläre Immunantwort aufgebaut werden. Es bleibt jedoch ein Restrisiko, so dass immunsupprimierte Patienten nach Immunisierung letal systemisch erkranken können. Außerdem besteht die Gefahr von genetischer Reversion, so dass die eigentlich attenuierten Mikroorganismen ihre Pathogenität zurückerlangen könnten. Eine andere und sicherere Immunisierungsmöglichkeit ist die Verwendung von abgetöteten Pathogenen oder deren Bestandteilen. Dazu werden Pathogene mit Stoffen wie Formalin oder Propiolacton behandelt. Auch hier liegen vollständige Proteine des Pathogens vor. Sie induzieren vor allem eine humorale Immunantwort. Die Kombination von wirksamen Antigenen und ausgewählten Adjuvantien ist dabei möglich, um die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen durch APCs und damit eine Immunantwort gegen die Antigene zu stärken (Vogel & Hem 2008). Unter Adjuvantien versteht man Wirkstoffe oder Moleküle, die eine Immunreaktion verstärken können. Darunter gehören zum Beispiel Aluminiumsalze (Alum), aber auch PAMPs wie TLR-Liganden, die Einfluss auf das angeborene Immunsystem haben. TLR-Liganden erfahren mittlerweile weite Verwendung in der Impfstoffindustrie. Der TLR9 Ligand CpG Oligodinucleotide (ODN) wird unterstützend für Influenza Vakzine eingesetzt und TLR4 stimulierende, LPS-ähnliche Strukturen (Monophosphoryl-Lipid A (MPL-A)) werden bei der Hepatitis B Impfung verwendet (Klinman *et al.* 2000). Vakzinierungen mit attenuierten Pathogenen können jedoch zu stärkeren Nebenwirkungen wie lokalen Entzündungsreaktionen oder Fieber führen und auch eine vollständige Replikationsunfähigkeit muss zuvor validiert werden. Bei einigen Pathogenen wie Malaria ist die Vakzinierung mit Lebend- oder Totimpfstoffen zudem nicht sehr effektiv (Moorthy & Hill 2002). Hier behilft man sich alternativer Ansätze, bei denen nur einzelne Bestandteile des Pathogens verwendet werden. Eine Möglichkeit ist dabei die DNA-Vakzinierung, bei der lentivirale oder adenovirale Vektoren mit pathogenen Informationen ausgestattet werden, um so im Individuum selbst pathogene Proteine oder deren Untereinheiten zu exprimieren und das Immunsystem des Wirtes mit diesen Strukturen in Kontakt zu bringen und auf das Pathogen vorzubereiten. Um die Immunogenität zu steigern, können ebenfalls für Zytokine kodierende Bereiche in diese Vektoren eingebaut werden, die ebenfalls im Wirt exprimiert werden. So können sowohl zelluläre als auch humorale Antworten induziert werden. Hierdurch umgeht man zusätzlich die Sicherheitsrisiken von Lebend- oder Totimpfstoffen. Der Nachteil dieser Methode

ist jedoch eine mögliche Immunantwort gegen das als Vehikel eingesetzte Adenovirus selbst, so dass ein früherer natürlicher Kontakt mit einem viralen Vektor den Immunisierungseffekt mindert (Robertson *et al.* 2008, Patterson *et al.* 2009). Lentivirale Vektoren können zudem zufällig Onkogene aktivieren und so das Krebsrisiko erhöhen (Montini *et al.* 2009).

Herkömmliche Lebend- oder Totimpfstoffe sind u.a. für die Influenza Immunisierung sehr effektiv. Sie beruhen ebenfalls auf attenuierten Viren, die zusammen mit Adjuvantien vor allem protektive Antikörper-Antworten gegen virale Oberflächenproteine induzieren. Viele dieser protektiven Impfstoffe induzieren schützende Antikörper, deren neutralisierende Funktion allerdings abhängig von Faktoren wie Affinität, Isotyp-Klasse oder dem Komplement ist. Gegen einige andere Pathogene wie HIV oder den Malaria Erreger Plasmodium, werden weitere Bestandteile des adaptiven Immunsystems benötigt, um die Infektion zu kontrollieren und das Pathogen zu beseitigen (Belyakov *et al.* 1998, Ishii *et al.* 2011, Hom *et al.* 1991, Homsy *et al.* 1989, Takeda *et al.* 1988, Krzych *et al.* 2000, Moorthy & Hill 2002). Ein T-Zell bedingter Schutz ist hier essentiell. Um gezielt effektiven T-Zellschutz gegen ein Pathogen zu erzeugen, verwendet man konjugierte Impfstoffe, die aus beliebigen Antigenen zusammengestellt werden. Eine Möglichkeit ist dabei die rekombinante Synthetisierung von Proteinen oder Peptiden. Bestimmte immunogene Proteine eines Pathogens können so für den Impfstoff verwendet werden. Viele Proteine oder Peptide allein sind jedoch sehr ineffizient die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine zu induzieren und führen bei alleiniger Anwendung eher zur Induktion von Toleranz (Larche *et al.* 2005). Deshalb müssen sie ebenfalls zusammen mit adjuvanten Stoffen appliziert werden, so dass sie im Idealfall gemeinsam mit dem Antigen die APC erreichen. Der Einsatz von Peptid- basierenden Impfstoffen, bei denen anstelle des gesamten Pathogens oder Proteine nur auf identifizierte T-Zellepitope aus pathogenen Proteinen zurückgegriffen wird, ermöglicht die Induktion eines zielgerichteten Immunschutzes gegen bestimmte Antigene. Im Menschen sind diese noch durch die genetisch determinierten HLA („human leukocyte antigen“, humanes Äquivalent des MHCs)-Allele restringiert, so dass APCs aufgrund eines bestimmten Genotyps nur bestimmte Antigene präsentieren können. Deshalb sind Impfstoffe von Vorteil, die mehrere Peptidvarianten beinhalten und durch Auswahl HLA relevanter Epitope individuell für Patienten zusammengestellt werden

können. Die Vorteile liegen hier u.a. in einem sehr niedrigem Sicherheitsrisiko und einer kostengünstigen Produktion. Der gemeinsame Transport von Antigen und Adjuvans zu Zellen des angeborenen Immunsystems kann durch geeignete Vehikel gesteigert und das Risiko von Nebenwirkungen reduziert werden (Zolnik *et al.* 2010). Ein vielversprechender Ansatz sind dabei partikuläre Strukturen wie etwa Nanopartikel, die mit PAMPs und antigenem Material eines Pathogens ausgestattet werden können, so dass sie das angeborene Immunsystem aktivieren und effektiv eine adaptive Immunantwort einleiten können. Dabei ist nicht nur der Transport von Antigenen zu APCs möglich, sondern generell der Transport von einer Vielzahl an verschiedenen Molekülen wie etwa Nukleotidsequenzen, z.B. DNA oder RNA, um z.B. Genexpressionen gezielt zu steuern. Wichtig ist dabei biologische Verträglichkeit der Transportvehikel, so dass Zellen nicht geschädigt werden oder keine Rückstände im Organismus verbleiben. Biologisch abbaubare Nanopartikel, wie etwa Chitosan oder PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) Nanopartikel, wurden bereits in verschiedenen Infektionsmodellen eingesetzt, um schützende adaptive Immunantworten zu induzieren (Amidi *et al.* 2007; Keijzer *et al.* 2011). Allerdings besitzen diese Systeme einige Limitierungen. So können nicht alle Arten von Molekülen über diese Nanopartikel transportiert werden und sind kostenintensiv in der Produktion. Deshalb wird stetig nach neuen, kostengünstigen und sehr gut modifizierbaren Systemen gesucht. Die Effektivität solcher Nanopartikel und auch die Verminderung von Nebenwirkungen kann durch Nanopartikel gebundene spezifische Antikörper gesteigert werden, die auf einen speziellen Zelltyp oder auch zelluläre Kompartimente abzielen (Kalkanidis *et al.* 2006) und so vielversprechend für zukünftige Vakzinierungsansätze sind. Eine Möglichkeit dafür stellen Calciumphosphat Nanopartikel dar (Sokolova *et al.* 2007). Mehrere Studien konnten den Nutzen als biomedizinisches Transportvehikel für Moleküle verschiedenster Art wie Nukleinsäuren, Proteine, Peptide und andere zeigen (Epple *et al.* 2010, Sokolova *et al.* 2012). Da sie Bestandteil vieler biologischer Gewebe sind, zeigen sie eine ausgezeichnete Biokompatibilität und werden von Zellen hervorragend aufgenommen sowie ausgeschieden (Dorozhkin *et al.* 2002, Neumann *et al.* 2009). Durch die effektive Aufnahme und nicht-Toxizität gegenüber Zellen stellen sie ein potentiell Vehikel für den Transport von immunogenen Peptiden und PAMP-Strukturen dar. Ob sich

Calciumphosphat Nanopartikel auch für die Induktion von schützenden antiviralen T-Zellantworten eignen, wird in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.3 Influenzaviren

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviren. Innerhalb der Influenzaviruskategorie unterscheidet man wiederum drei verschiedene Virus Typen: Influenza A, Influenza B und Influenza C, wobei epidemiologisch nur die Typen A und B beim Menschen interessant sind (Wright and Webster 2001). Influenza Viren des Typs A besitzen die beim Menschen die größte Virulenz. Die Infektion mit Typ A verursacht akute, respiratorische Erkrankungen, die durch markante Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber und Tracheitis geprägt sind. Influenza A Viren können in weitere Subtypen unterteilt werden, die abhängig von der Zusammensetzung der viralen Hüllproteine Hemagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) eingeteilt werden (Baron 1996; Wright and Webster 2001). Bisher sind 16 verschiedene HA und 9 NA Subtypen bekannt (Fouchier *et al.* 2005). Die spezielle Nomenklatur eines Influenza Virusisolats ergibt sich aus dem Virus Typ, dem geographischen Isolierungsort, gefolgt von Seriennummer, Jahr der Isolierung und zuletzt die HA und NA Varianten. Das in dieser Arbeit verwendete humanpathogene Influenza A Virus PR/8/34 H1N1 wurde demnach in Puerto Rico 1934 isoliert und trägt die Seriennummer 8. Das Virus selbst trägt jeweils die HA und NA Variante 1.

Die Vielfalt an unterschiedlichen Subtypen von HA und NA ergibt sich aus zwei verschiedenen Mutationsereignissen. Verantwortlich für die hohe Mutationsrate der Influenza A Viren ist die fehlende Lesekorrektur der viruseigenen RNA Polymerase, die den durch Punktmutationen beeinflussten antigenen Drift und so die Flucht des Virus vor dem adaptiven Immunsystem begünstigt. Ein weiteres Problem ist der sogenannte antigene Shift. Ein Phänomen, das bei Infektion einer einzelnen Zelle mit unterschiedlichen Influenza Virus Typen stattfinden kann. Dabei werden während des Replikationsprozesses virale RNA Segmente ausgetauscht, wodurch neue Virusvarianten entstehen. Antigenshifts sind hauptsächlich für den Ausbruch gefährlicher Pandemien verantwortlich (Hilleman 2002).

1.3.1 Struktur und Replikation von Influenza A Viren

Influenza Viruspartikel haben eine Größe von 80 bis 120 Nanometern im Durchmesser. Die Zusammensetzung ist bei Typ A und B ähnlich. Die aus einer Lipiddoppelschicht bestehende Virushülle enthält die drei Glykoproteine HA, NA und das Matrixprotein 2 (M2), und umschließt das Nukleokapsid, das in helikaler Symmetrie vorliegt. Das Nukleokapsid ist ein Komplex bestehend aus dem einzelsträngigen antisense (-) RNA Genom, sowie den viralen Proteinen M1, Nukleoprotein (NP), RNA Polymerase (PA) und Polymerase-bindenden Proteinen 1 und 2 (PB1, PB2). Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung eines Influenza Viruspartikels. Das virale RNA Genom besteht aus 8 Teilsegmenten, wovon jedes ein bis zwei Gene enthält, die für insgesamt 10 oder 11 virale Proteine kodieren (Bouvier and Palese 2008). Neben HA, NA, NP, M1, M2, PB1, PB2 sind dies die Nichtstruktur Proteine 1 und 2 (NS1, NS2) und teilweise PB1-F2.

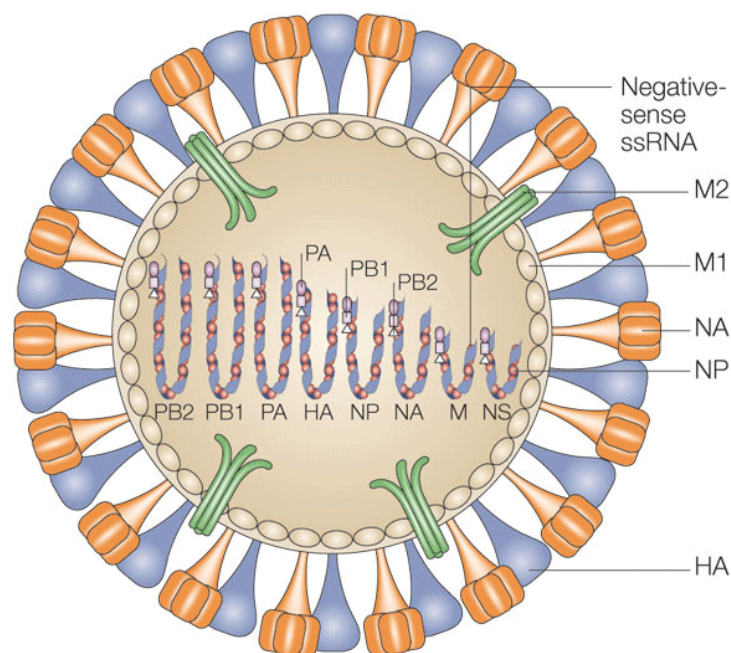


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Influenza A Viruspartikels (Horimoto and Kawaoka 2005). Das RNA Genom ist mit mehreren viralen Proteinen in einem Komplex assoziiert (Nukleokapsid) und liegt in helikaler Form vor. Es wird von M1 und einer Lipiddoppelschicht umhüllt, die die Proteine HA, NA und M2 enthält. PB1: Polymerase-bindendes Protein 1; PB2 Polymerase-bindendes Protein 2; PA: RNA Polymerase; NS: Nicht Strukturprotein; NP: Nukleoprotein; M1: Matrixprotein 1; HA: Hemagglutinin; NA: Neuraminidase; M2: Matrixprotein 2

Die Replikation von Influenzaviren ist ein mehrschrittiger und am Ende zelllytischer Prozess, der zunächst durch die Bindung des Viruspartikels an die Zielzellmembran initiiert wird (Abb. 1.4). Infiziert werden vor allem Epithelzellen des Respirationstraktes. HA ist dabei für den Infektionsprozess wichtig. Zunächst bindet das HA an Sialinsäure-haltige Glykoproteine der epithelialen Wirtszellmembran. Die HA-Variante ist dabei von Bedeutung und kann aufgrund des HA-Wirtszellrezeptors die Infektiösität beeinflussen (Steinhauer 1999; Yang *et al.* 2007). Nach der Spaltung des HA durch eine Protease wird das Virus mittels Endozytose aufgenommen. Nach pH abhängigen Prozessen im Endosom kommt es zur Freilassung des viralen Nukleokapsids ins Zytoplasma der infizierten Zelle (Bouvier and Palese 2008). Daraufhin wird das Nukleokapsid in den Wirtszellkern translokalisiert, wo es schließlich zur Transkription des viralen negativ-orientierten RNA Genoms zu mRNAs kommt. Im Zytoplasma werden die viralen Proteine an wirtseigenen Ribosomen translatiert. Neu synthetisierte Proteine werden vom Golgi Apparat sekretiert und in die Zellmembran eingebaut. Im Zellkern werden aus RNA Fragmenten, PA und anderen viralen Proteinen neue Nukleokapsidkomplexe zusammengefügt (Neumann and Kawaoka 2011). Es kommt zum Transport der Nukleokapsidkomplexe zu HA, NA und M2 reichen Zellmembranbereichen, worauf sich Viruspartikel von der Zellmembran abschnüren („budding“) (Leser and Lamb 2005). Die Freisetzung erfolgt schließlich nach Spaltung von Sialinsäuren der Membranglykolipide und –proteine durch NA. Die Anheftung an die bereits infizierte Zelle wird somit verhindert (Nayak *et al.* 2004).

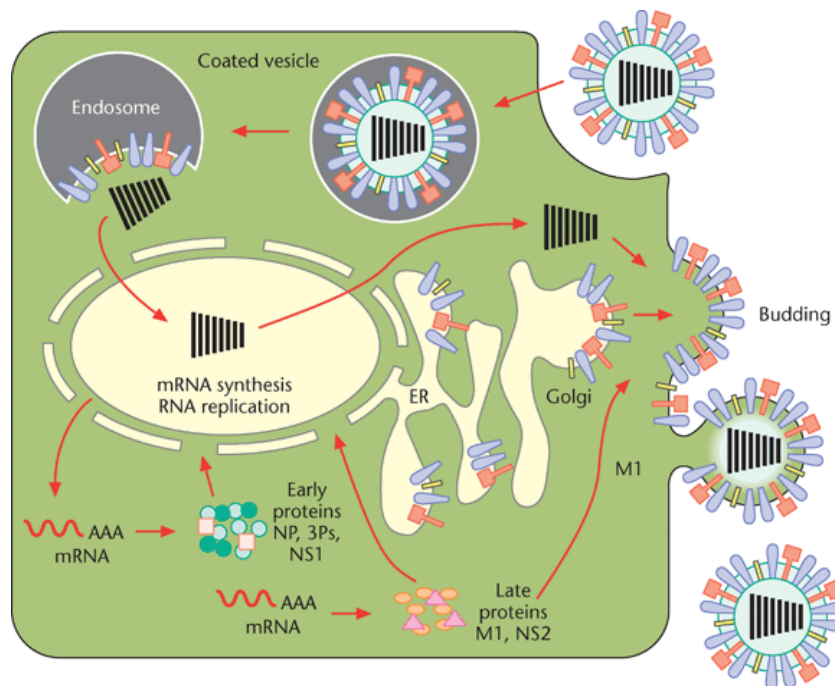


Abbildung 1.4: Replikationszyklus von Influenza A Viren (nach Neumann & Kawaoka 2011). Die Adsorption des Influenza Viruspartikels erfolgt über die Bindung von HA an Sialinsäure-haltige Glykoproteine der Wirtszellmembran. Anschließend erfolgt die Aufnahme des Partikels über Endozytose. Durch Ansäuerung des Endosoms kommt es zur Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma, von wo aus es in den Zellkern transportiert, in mRNA umgeschrieben und an zelleigenen Ribosomen translatiert wird. HA, NA und M2 werden in die Zellemembran eingebaut, wo die Verpackung neuer viraler Partikel stattfindet. Nach Abknospung wird ein infektiöses Viruspartikel freigesetzt.

1.3.2 Immunantwort bei Influenza A Infektion

Zur Untersuchung der Immunantwort bei der Influenza-Infektion werden häufig Tiermodelle heran gezogen. Besonders das Mausmodell ist aufgrund praktischer Vorteile und großer Homologien zum Menschen essentiell geworden, um die immunologischen Vorgänge der Infektion zu verstehen und vorklinische Studien zu neuen Vakzinierungsansätzen durchzuführen (Bouvier and Lowen 2010). Eine Infektion mit einem Influenza A Virus aktiviert sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort des Wirtes. Die klinischen Symptome der Infektion werden dabei auf die initialen Reaktionen des angeborenen Immunsystems nach Infektion zurückgeführt. Von besonderer Bedeutung ist hier die Freisetzung der Interferone des Typs I (α , β) sowie die Einwanderung von Neutrophilen oder Natürlichen Killerzellen (Mandelboim *et al.* 2001). Hierbei stellt die angeborene Immunantwort eine erste wichtige Barriere zur Einschränkung der viralen Replikation und weitere Aktivierung der adaptiven Immunantwort dar. In den Lungen ansässige DCs nehmen Antigene des Virus auf und wandern in den drainierenden Lungenlymphknoten ein, wo sie auf T-Zellen mit passendem T-Zellrezeptor treffen

(Legge and Braciale 2003). Virusspezifische T-Zellen entwickeln daraufhin Effektorfunktionen und migrieren zur Infektionsstelle in der Lunge. Bei Erstinfektion mit einem Influenza A Virus sind besonders zytotoxische CD8⁺ T-Zellen für Kontrolle und Klärung der Infektion wichtig, aber nicht unabdingbar (Woodland 2003). Während einer Primärinfektion bildet sich ein immunologisches T-Zellgedächtnis, welches bei Reinfektion eine bessere Infektionskontrolle erlaubt (Woodland and Scott 2005). Infiziert sich ein Individuum erneut mit der gleichen Virusvariante, werden sowohl CTLs als auch T_H1- und T_H2-Zellen mit einer Kontrolle der Infektion assoziiert. Im Tiermodell induziert eine Influenza-Infektion vor allem eine T_H1 vermittelte Immunantwort, jedoch konnten auch die T_H2 typischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 in der Lunge nachgewiesen werden (Treanor *et al.*, 2005). T_H1 Zellen vermitteln hierbei eine schützende Immunität und fördern durch die Sekretion von IFN- γ die Entwicklung virusspezifischer CTLs. Die Bedeutung einer effektiven CTL Antwort wird bei adoptiven Transfer Experimenten in der Maus deutlich, bei denen durch Übertragung virusspezifischer CTLs Heilung vermittelt werden kann (Lawrence *et al.* 2005; Lawrence and Braciale 2004). Durch ihre Spezifität für interne virale Antigene vermitteln CTLs einen sogenannten Kreuzschutz gegen verschiedene Influenza A Virusvarianten (Treanor *et al.* 2005).

Bei Reinfektion reagieren zuerst die Lungen ansässigen Gedächtnis T-Zellen auf die Infektion, hauptsächlich mit der Produktion antiviral wirkender Zytokine, um die virale Replikation einzuschränken und die Virusverteilung zu verringern. Darauf folgt die Einwanderung von Gedächtnis T-Zellen, die nicht an der Infektionsstelle vorhanden sind, sowie die Antigen-abhängige Expansion Virus-spezifischer Gedächtnis T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen wie dem Lungenlymphknoten, die ebenfalls zur Infektionsstelle rekrutiert werden (Woodland and Randall 2004). Von besonderer Wichtigkeit sind auch T_H2-Zellen, die mit B-Zellen interagieren und eine humorale Immunantwort induzieren (Palladino *et al.* 1995; Renegar *et al.* 2004). Durch direkten Kontakt und Zytokine stimulieren T_H2 Zellen die Sekretion von IgA und IgG Antikörpern, vor allem gegen die viralen Oberflächenproteine HA und NA, die serologisch auch zur Identifizierung der Virusvariante herangezogen werden können. Neutralisierende anti-HA Antikörper bieten Schutz bei Infektion mit homologen Viren (Renegar *et al.* 2004). Deshalb ist die Induktion solcher Antikörper auch eines der Hauptziele bei

der Entwicklung vieler Vakzine (Treanor *et al.* 2005). Antikörper gegen interne Antigene spielen beim Schutz gegen diese Infektion dagegen keine Rolle.

Der von neutralisierenden Antikörpern und CTLs ausgehende immunologische Druck auf die Oberflächenproteine HA und NA begünstigt die Etablierung neuer Mutationen und so die Entstehung neuer Varianten dieser Proteine (antigener Drift), die Grundlage für Influenza Epidemien (Behrens and Stoll 2006).

1.4 Retroviren

Retroviren sind einzelsträngige RNA Viren, die sich weiter in drei Unterfamilien einteilen lassen: Onkoviren, Lentiviren, Spumaviren. Die Onkoviren werden dabei nochmal in α , β , γ , δ und ϵ -Viren eingeteilt. Grundsätzlich können Retroviren anhand der Komplexität ihres Genoms in einfache und komplexe Retroviren unterschieden werden. Einfache Retroviren wie α , β und γ besitzen nur die Gene *gag* (group specific antigen), *pol* (Polymerase) und *env* (Envelope). Das Genom der komplexen Retroviren (Lenti-, Spuma-, δ und ϵ -Viren) kodiert dagegen zusätzlich für weitere regulatorische und akzessorische Proteine (Kurth and Bannert 2010).

Retroviren benötigen das Reverse Transkriptase Enzym um das virale RNA-Genom während der Virusreplikation in DNA umzuschreiben (Baltimore 1970). Eine Besonderheit der Retroviren ist die Integration des viralen Genoms in das der Wirtszelle. Im weiteren Verlauf der viralen Replikation wird das integrierte Virusgenom mithilfe von zellulären Polymerasen transkribiert.

1.4.1 Struktur und Replikation von Retroviren

Retroviren sind umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen (+) RNA Genom (7-12 Kilobasen). Die Viruspartikel besitzen eine Größe von etwa 80 bis 100 nm. Das aus Kapsidproteinen, 2 ssRNA-Strängen, Integrase und Reverse Transkriptase bestehende Nukleokapsid wird von Matrixproteinen und einer ursprünglich der Wirtszellmembran abstammenden Lipiddoppelschicht umgeben. Das *gag* Gen kodiert für die Matrixproteine, sowie Kapsid- und Nukleoproteine (Abb. 1.5). *Pol* enthält die Informationen für die beiden viralen Enzyme Integrase und Reverse Transkriptase, wobei das *env* Gen für die Oberflächen- und

Transmembranbestandteile kodiert. Die Informationen für die proteolytische Spaltung der viralen Proteine wichtige Virusprotease liegt auf dem *pro* Gen. Zwei 200 – 600 bp lange DNA-Wiederholungseinheiten („long terminal repeats“, LTR) umgeben die retroviralen Gene. Nach dem Herausschneiden ermöglichen sie wieder die Reintegration ins Wirtsgenom und können zudem durch Sequenzen zur Genexpressionsregulierung (Enhancer, Promotor, Polyadenylierungssignal) die Transkription steuern (Coffin *et al.* 1997; Kurth and Bannert 2010).

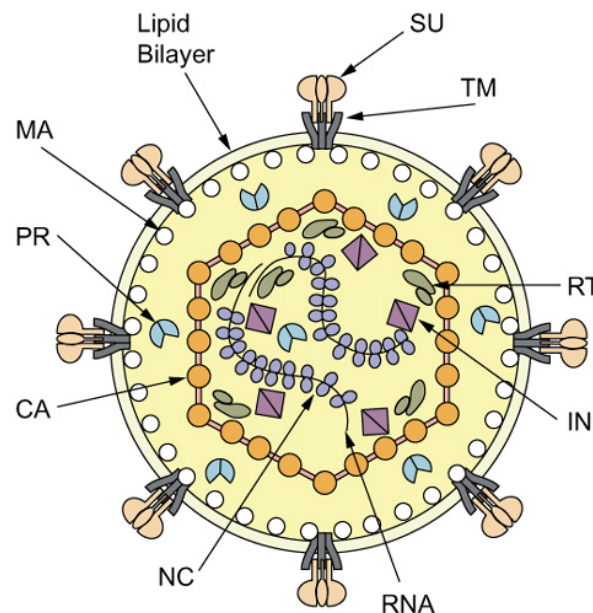


Abbildung 1. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von Retroviren (nach Coffin *et al.*, 1997). Das virale RNA Genom ist mit viralen Proteinen im Nukleokapsid assoziiert. Das Nukleokapsid ist von Matrixproteinen und einer Lipiddoppelschicht umhüllt. RNA: Genom; NC: Nucleokapsid; IN: Integrase; RT: Reverse Transkriptase; CA: Kapsid; PR: Protease; MA: Matrixprotein; TM: Transmembranprotein; SU: Glykoprotein

Der mehrschrittige Replikationsprozess (Abb. 1.6) beginnt bei Retroviren mit der Adsorption des Viruspartikels an die Wirtszellmembran. Dabei binden jeweils Glykoproteine der Virushülle an spezifische Rezeptoren der Wirtszelloberfläche. Bei Bindung des HIV (Humanes Immundefizienz Virus) an die Wirtszielzelle bindet beispielsweise das Glykoprotein 120 (gp120) an CD4 Moleküle. Nach Konformationsänderung des gp120 ist die zusätzliche Bindung an einen Ko-Rezeptor (CCR5 oder CXCR4) nötig (Wyatt and Sodroski 1998). Anschließend fusioniert die Virushülle mit der Wirtszellmembran, woraufhin das Nukleokapsid ins

Zytoplasma der Zielzelle gelangt. Nach Auflösung des viralen Kapsids wird die Reverse Transkriptase aktiviert und das RNA Genom des Virus in DNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase besitzt keine Fehlerlesekorrektur, so dass das Genom der Retroviren vielen Mutationen unterliegen kann. Mit Hilfe zellulärer und viraler Proteine wird das umgeschriebene Genom in den Wirtszellkern transportiert, woraufhin mit Hilfe der Integrase der Einbau ins Wirtsgenom erfolgt. Aufgrund der RNA Polymerase II Aktivität entstehen vollständige und „gespligte“ mRNA Moleküle die ins Zytoplasma der Zelle transportiert werden. Virale Proteine werden an wirtszelleigenen Ribosomen translatiert. Die viralen Oberflächenproteine werden in die Zellmembran eingebaut. Vollständige RNA Kopien werden in neue Viruspartikel verpackt. An der Zellmembran kommt es anschließend zusammen mit viralen Proteinen zum Zusammenbau neuer Viruspartikel, die sich mit einem Teil der Plasmamembran von der Zelle abschnüren („budding“) (Kurth & Bannert, 2010).

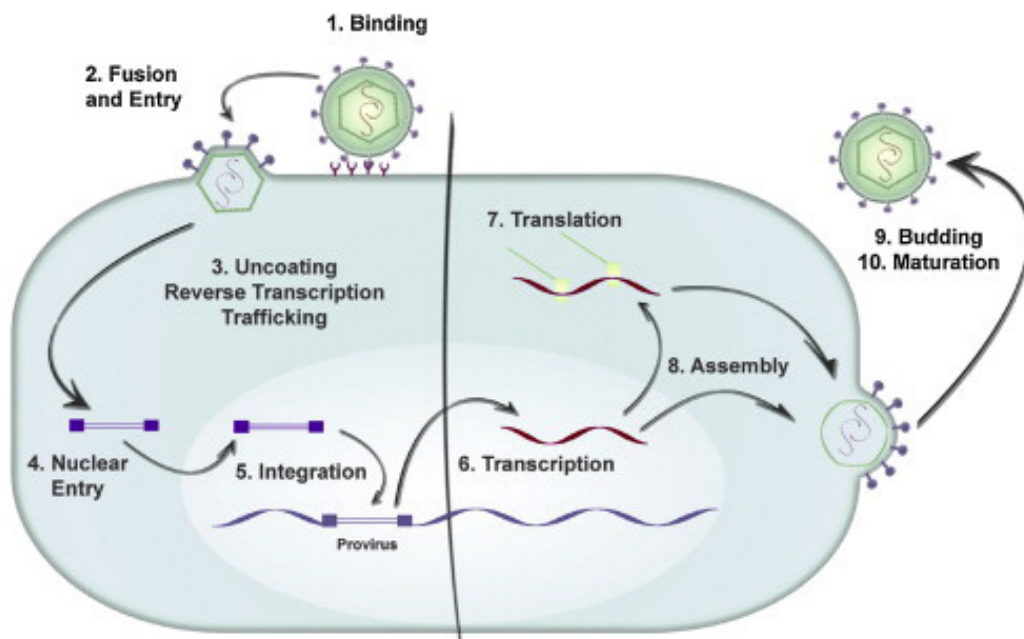


Abbildung 1.6: Replikationszyklus von Retroviren (nach Spencer and Palmarini 2012). Glykoproteine des Virus binden an einen jeweils spezifischen Rezeptor der Zielzelle. Anschließend fusioniert das Viruspartikel mit der Zellmembran, so dass das Nukleokapsid ins Zytoplasma gelangt. Hier kommt es zur reversen Transkription des RNA Genoms in DNA, welche anschließend in den Zellkern transportiert und mittels Integrase Enzym in das Wirtszellgenom integriert wird. Von hier aus findet die Transkription proviraler RNA statt, die im Zytoplasma in virale Proteine translatiert wird. Schließlich findet die Verpackung neuer Viruspartikel an der Wirtszellmembran statt. Neue Viruspartikel werden durch Abknospfung freigesetzt.

1.4.2 Friend Virus als Tiermodell für retrovirale Infektionen

Das AIDS auslösende HIV ist mit weltweit 33 Millionen infizierten Menschen ein globales Problem. Bisher vermittelt keiner der bis heute entwickelten Impfstoffe einen weitreichenden Schutz vor der HIV-Infektion. Da es sich bei HIV um ein humanpathogenes Virus handelt, ist die Wahl eines geeigneten experimentellen Tiermodells schwierig. Das dem Menschen sehr ähnliche Schimpansenmodell ist nur bedingt einsetzbar, da die meisten HIV-Isolate sehr schlecht im Schimpansen replizieren und es nicht zu Krankheitsverläufen kommt wie sie beim Menschen zu beobachten sind (Novembre *et al.* 2001; O'Neil *et al.* 2000). Deshalb behilft man sich mit ähnlichen Virusmodellen, zum Beispiel dem Simian Immundefizienz Virus (SIV) in Makaken. Nicht zuletzt wegen des fehlenden Verständnisses der immunologischen Vorgänge im Affenmodell stellt dieses Modell trotzdem nicht die ideale Methode dar. Dagegen lassen sich sowohl immunologische Vorgänge als auch praktische experimentelle Vorteile mit dem Mausmodell besser umsetzen. Verschiedene onkogene Retrovirusmodelle sind im Mausmodell verfügbar. Das Friend Virus Modell ist eines von ihnen. Friend Virus (FV) ist ein Retroviruskomplex aus dem pathogenen replikationsunfähigen „spleen focus forming virus“ (SFFV) und dem replikationskompetenten aber apathogenen „Friend murine leukemia virus“ (F-MuLV). FV induziert in adulten infizierten Mäusen eine letale Erythroleukämie (Hasenkrug and Chesebro 1997). Zwar ist das FV Modell aufgrund der pathologischen Aspekte nicht mit einer HIV-Infektion vergleichbar, allerdings sind während der akuten Phase beider Infektionen große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (Dittmer and Hasenkrug 2001). Das FV Modell bietet deshalb die Möglichkeit, die immunologischen Vorgänge einer retroviralen Infektion gut zu untersuchen. Dem Genotyp der entsprechenden Mausstämmen zugrunde liegend, lassen sich sowohl akute als auch chronische Infektionen untersuchen. Die Suszeptibilität bzw. Resistenz gegen eine FV-Infektion wird dabei durch eine Reihe von Genen vermittelt. Davon mindestens vier Gene des MHC, in der Maus auch als H2 bezeichnet, die die humorale und zelluläre Immunantwort beeinflussen. Die H2-Gene sind wichtig für die Präsentation der viralen T-Zell Epitope auf MHC Molekülen. Man unterscheidet hier die resistenten H2^b von den suszeptiblen H2^d und H2^a Haplotypen (Chesebro *et al.* 1974). Der Mausstamm CB6F1 mit dem Haplotyp H2^{b/d} ist hoch suszeptibel für eine FV-Infektion und

eignet sich beispielsweise für Studien über akute retrovirale Infektionsvorgänge, wohingegen C57BL/6 Mäuse resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie sind.

1.4.3 Immunantwort gegen eine Friend Virus Infektion

Für einen vollständigen immunologischen Schutz gegenüber einer FV-Infektion sind sowohl CTLs, T_H-Zellen als auch eine humorale Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern wichtig (Chesebro *et al.* 1974; Hasenkrug and Chesebro 1997). Dass eine Kombination aus allen Bereichen der adaptiven Immunantwort wichtig ist, zeigen Experimente, bei denen eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen zu einem Kontrollverlust der Infektion in resistenten Mäusen führt. Besonders CD8⁺ T-Zellen vermitteln durch das Abtöten infizierter Zellen mittels zytotoxischer Granula eine Senkung der viralen Verbreitung. Eine fehlerhafte humorale Immunantwort, bei der neutralisierende Antikörper gebildet werden, resultiert in hohen Mortalitätsraten (Chesebro *et al.* 1974; Hasenkrug *et al.* 1995). Regulatorische T-Zellen spielen bei der chronisch persistenten Infektion von resistenten Mäusen eine Rolle, da hier die FV-Infektion T_{reg} Zellen induziert, die immunsuppressiv auf die zelluläre Immunantwort wirken (Dietze *et al.* 2011; Dittmer *et al.* 2004).

In Bezug auf die Resistenz gegenüber FV ist das *Fv-2* Gen sehr wichtig, das bei C57BL/6 Mäusen nicht vorhanden ist und so die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozytenvorläuferzellen limitiert (Hoatlin and Kabat 1995; Peterson *et al.* 2000). Sie bilden keine Erythroleukämie aus, bleiben aber persistent infiziert. Der H2-Haplotyp der verschiedenen Mausstämmen beeinflusst auch die Kinetik der Virusinfektion. Suszeptible Mäuse zeigen zum Beispiel eine verzögerte und schwächere Immunantwort, was dem Virus einen Vorsprung vermittelt und es zu einer starken Vermehrung kommt, bevor das Immunsystem die Infektion kontrollieren kann.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Infektionskrankheiten fordern das Immunsystem zu besonderen Höchstleistungen heraus. Das Immunsystem adaptiert an das eingedrungene Pathogen und versucht es zu bekämpfen. Gegen viele Pathogene kann sich das Immunsystem durch seine komplexe Struktur und mannigfaltigen Eigenschaften erfolgreich wehren. Angeborenes und adaptives Immunsystem arbeiten hierbei eng zusammen. Gegen einige Pathogene gelingt dies allerdings nicht und es besteht die Gefahr von chronisch-persistenten Infektionen, die den Organismus dauerhaft schädigen können. Gegen diese Pathogene, wie z.B. das Hepatitis B Virus, haben sich erfolgreich Immunisierungsansätze durchgesetzt, bei denen das Immunsystem vor dem ersten Kontakt auf das Pathogen vorbereitet wird. Doch trotz des stetigen wissenschaftlichen Fortschritts existiert noch nicht gegen alle durch Pathogene hervorgerufene Erkrankungen ein effektiver Impfstoff. Bislang häufig genutzte Impfstrategien beruhen auf nicht lebensfähige oder abgetötete Pathogene, die zwar in vielen Fällen einen guten immunologischen Schutz vermitteln, jedoch nicht für alle Infektionskrankheiten erfolgreich und mit einigen Sicherheitsrisiken verbunden sind. Die Etablierung neuer Immunisierungsansätze ist daher weiterhin ein Schwerpunkt in der Impfstoffentwicklung.

Der Einsatz von Calciumphosphat Nanopartikeln als biomedizinisches Transportvehikel wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Calciumphosphat ist Bestandteil vieler biologischer Gewebe, besitzt eine gute Biokompatibilität und wird leicht von Zellen aufgenommen. In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob sich Calciumphosphat Nanopartikel als geeignetes Immunisierungsvehikel einsetzen lassen.

Im ersten Teil der Arbeit soll die Funktionalisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln mit Toll-like Rezeptor Liganden und viralen Antigenen etabliert und charakterisiert werden. Ziel ist es, Zellen des angeborenen Immunsystems effizient zu aktivieren und die Präsentation viraler Antigene zu ermöglichen, um Virus-spezifische T-Zellen zu induzieren.

Nach erfolgreicher Etablierung der optimalen Funktionalisierung der Calciumphosphat Nanopartikel soll im zweiten Teil der Arbeit die Aktivität dieser funktionalisierten Nanopartikel als Impfstoffvehikel *in vivo* getestet werden. Dazu soll sowohl der prophylaktische Einsatz gegen akute Virusinfektionen wie auch der therapeutische Einsatz bei einer chronischen Infektion untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen

PBS-Puffer (pH 7,0):

8 g/l	NaCl (Natriumchlorid, Roth, Karlsruhe)
0.2 g/l	KCl (Kaliumchlorid, Roth, Karlsruhe)
1.44 g/l	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat, Roth, Karlsruhe)
0.2 g/l	KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat, Roth, Karlsruhe)

FACS-Puffer:

PBS-Puffer

2 %	hitzeinaktiviertes FCS (<i>foetales calf serum</i> , PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
2 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Roth, Karlsruhe)

Erythrozyten-Lysis-Puffer (ACK-Puffer; pH 7,2-7,4):

8.29 g/l	NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid, Roth, Karlsruhe)
1 g/l	KHCO ₃ (Kaliumdihydrogenphosphat, Roth, Karlsruhe)
0.1 mM	EDTA

IMDM-Komplettmedium:

IMDM	mit GlutaMAX™ I und 25 mM HEPES (Invitrogen, Karlsruhe)
10 %	hitzeinaktiviertes FCS
100 µg/ml	Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
100 U/ml	Penicillin (Sigma-Aldrich, USA)
25 µM	2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)

DMEM-Komplettmedium:

DMEM	mit GlutaMAX™ I und 25 mM HEPES (Gibco, Karlsruhe)
10 %	hitzeinaktiviertes FCS (<i>foetales calf serum</i> , PAA Laboratories, Österreich),
100 µg/ml	Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
100 U/ml	Penicillin (Sigma-Aldrich, USA)
2 mM	L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching)

RPMI1640-Komplettmedium:

RPMI	mit GlutaMAX™ I und 25 mM HEPES (Gibco, Karlsruhe)
10 %	hitzeinaktiviertes FCS (<i>foetales calf serum</i> , PAA Laboratories, Österreich),
100 µg/ml	Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
100 U/ml	Penicillin (Sigma-Aldrich, USA)
2 mM	L-Glutamin

Ex-Cell 610-HSF Serumfreies Medium (SAFC Biosciences, St. Louis)

Elutionspuffer (pH = 3):

100 mM	Glycin (Roth, Karlsruhe)
--------	--------------------------

Neutralisationspuffer (pH = 7.5):

1 M Tris (Roth, Karlsruhe)

Collagenase/Dnase-Lösung:

FACS-Puffer

1 mg/mL Collagenase Typ D (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

10 µg/mL Deoxyribonuclease (Dnase) I Typ II (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
St. Louis, MO)

Trypanblau-Lösung:

0.5 g Trypanblau

0.9 g NaCl

100 ml H₂O

Ketamin/Xylazin-Lösung:

NaCl 0,8 %ige Lösung (Fresenius Kabi)

10 % Ketamin (100 mg/ml, Ceva Sante Animale, Düsseldorf)

2 % Xylazin (23,32 mg/ml, Ceva Sante Animale, Düsseldorf)

2.2 TLR-Liganden und Peptide

CpG-1826 Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Sequenz:

5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3', modifiziertes Phosphorthioat
(PTO))

poly(I:C) Sigma Aldrich (St. Louis, MO)

HA₁₁₀₋₁₂₀ SVSSFERFERFEIFPKES (Intavis AG, Köln)

HA₅₁₂₋₅₂₀ YQILAIYSTVASSLVLL (Intavis AG, Köln)

gp70₁₂₃₋₁₄₁ EPLTSLTPRCNTAWNRLKL (zur Verfügung gestellt von U. Dittmer,
Institut für Virologie Essen, Universität Duisburg-Essen)

GagL₈₅₋₉₃ CCLCLTVFL (zur Verfügung gestellt von U. Dittmer,
Institut für Virologie Essen, Universität Duisburg-Essen)

2.3 Versuchstiere

Versuchstiere waren zu Beginn mindestens 6 bis 8 Wochen alt und stammten aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Über die Dauer der Versuche wurden die Tiere unter SPF Bedingungen gehalten.

2.3.1 BALB/c Mäuse

Die verwendeten BALB/c Mäuse wurden aus den Laboratorien der Harlan Winkelmann GmbH bezogen. Die nachfolgend aufgelisteten transgenen Mäuse waren auf genetischem BALB/c Hintergrund und heterozygot für das jeweilige Transgen.

2.3.1.1 CL4-TCR Maus

Etwa 90 % der CD8⁺ T-Zellen exprimieren einen transgenen α/β -TCR aus. Dieser erkennt die im MHC I Molekül präsentierte Aminosäure Sequenz IYSTVASSL aus dem HA-Protein des Influenza A PR/8/34 Virus (HA₅₁₂₋₅₂₀) (Morgan *et al.* 1996). Diese Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und gehalten.

2.3.1.2 TCR-HA Maus

Etwa 20 % der CD4⁺ T-Zellen exprimieren einen transgenen α/β -TCR aus. Dieser erkennt die im MHC II Molekül präsentierte Aminosäure Sequenz FERFEIFPKES aus dem HA-Protein des Influenza A PR/8/34 Virus (HA₁₁₀₋₁₂₀) (Kirberg *et al.* 1994). Diese Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und gehalten.

2.3.2 CB6F1 Mäuse

Die verwendeten CB6F1 Mäuse wurden aus den Charles River Laboratorien bezogen.

2.3.3 C57BL/6 Mäuse

Die verwendeten C57BL/6 Mäuse wurden aus den Laboratorien der Harlan Winkelmann GmbH bezogen.

2.3.3.1 TLR3^{-/-}7^{-/-}9^{-/-} Knockout Mäuse

TLR3^{-/-}7^{-/-}9^{-/-} Knockout Mäuse hatten C57BL/6 Hintergrund und wurden von C. Kirschning (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen gehalten und gezüchtet.

2.4 Identifizierung transgener Mäuse

Für die Identifizierung von transgenen Mäusen wurden Schwanzbiopsien entnommen und PCR-Amplifikationen aus genomischer DNA für die entsprechenden Transgene durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Primerpaare.

Tabelle 2.1: Oligonukleotidprimerpaare zur Identifizierung transgener Mäuse.

Transgen	Primer	Annealing-Temperatur
CL4-HA	5'-GCAGGGCTGAAAGAACAGCAA-3' 5'-GCTTCCTCCAGAATTTGAGGC-3'	58°C
TCR-HA	5'-TAGGAGAAAGCAATGGAGAC-3' 5'-GTACCTGGTATAACACTCAG-3'	58°C

Die PCR-Amplifikationen wurden mit den folgenden Programmen im Thermocycler (T3 Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Identifikation transgener Mäuse.

	10 Zyklen				27 Zyklen		
Temperatur °C	95	95	T _A	72	95	T _A	72
Zeit (Min:Sek)	10:00	0:30	1:30	1:30	0:15	0:45	1:30

Der Standardreaktionsansatz für die PCR-Reaktion bestand dabei aus:

Tabelle 2.3: Standardreaktionsansatz einer PCR-Reaktion.

x ng	Genomische DNA
1x	Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
1.5 mM	MgCl ₂ (Promega, Mannheim)
1 mM	dNTP Mix (1 mM jedes Nukleotid) (Fermentas, St. Leon-Rot)
5 µM	Vorwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
5 µM	Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
0.5 U	GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, Mannheim)
20 µl	H ₂ O steril

Für den Nachweis des Transgens im PCR Produkt wurden Agarosegele aus TBE-Puffer, 1% Agarose (Biobudget, Krefeld), und 0.5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) hergestellt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100-150 V. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe einer Geldokumentationskammer (Intas, Göttingen) sichtbar gemacht und analysiert.

2.5 Herstellung von Calciumphosphat Nanopartikeln

2.5.1 Funktionalisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln mit TLR-Liganden und viralen Antigenen

Die Herstellung wurde wie in Sokolova *et al.* 2010 beschrieben durchgeführt. Calciumphosphat Nanopartikel wurden durch schnelles Vermischen von wässrigen Calciumnitrat (6,25 mM, Riedel-de Haën, Seelze) sowie di-Ammoniumhydrogenphosphat (3,74 mM, Merck, Darmstadt) Lösungen hergestellt. Zuvor wurde der pH-Wert mit Natriumhydroxid (0,1 M, Merck, Darmstadt) beider Lösungen auf 9 eingestellt. Das Vermischen wurde durch pumpen beider Lösungen in ein Glasgefäß erreicht. Direkt nach dem Vermischen wurde je 1 ml der Calciumphosphat Lösung mit 0,2 ml der gelösten Oligonucleotidsequenzen mit

CpG Mustern (400 µg/ml; CpG) und/oder poly(I:C) (1 mg/ml) in einem Eppendorf Gefäß vermengt.

Für die Herstellung von mehrschaligen Nanopartikeln, wurde zu der hergestellten CaP/CpG/poly(I:C)-Lösung nochmal 50 µl des viralen Peptids (1 mg/ml; HA₁₁₀₋₁₂₀, HA₅₁₂₋₅₂₀, gp70₁₂₃₋₁₄₁ oder GagL₈₅₋₉₃) und 0.5 ml weiterer Calciumnitrat (6.25 mM) sowie di-Ammoniumhydrogenphosphat (3,74 mM) Lösung hinzugegeben. Für eine abschließende Stabilisierung der partikulären Strukturen wurden 0,2 ml des CpGs (400 µg/ml) dazu gegeben.

Die finale Konzentration der zugefügten Komponenten für dreischalige Nanopartikel liegt bei: 65,46 µg/ml CpG, 163 µg/ml poly(I:C) und 20,4 µg/ml des entsprechenden Peptids.

Für die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmestudien wurden anstelle des CpGs modifiziertes an das Fluorophor Alexa Fluor 488 konjugiertes CpG^{Alexa488} (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (CaP/CpG^{Alexa488}/CaP/CpG^{Alexa488}), teilweise ohne Zugabe eines zusätzlichen Peptids.

Für die intranasale und subcutane Immunisierung wurden dreischalige Nanopartikel (CaP/CpG/HA/CaP/CpG) wie beschrieben synthetisiert. Anschließend wurde eine Ultrazentrifugation für 30 min bei 66000 g durchgeführt und der Überstand von den Nanopartikeln entfernt. Danach wurden die Nanopartikel mit einem Ultraschallbad (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology; Zyklus 0.8, Amplitude 60 %) für 10 Sekunden in Wasser resuspendiert. Die finalen Konzentrationen der zugefügten Komponenten lag bei: 130,92 µg/ml CpG und 40,8 µg/ml des entsprechenden HA-Peptids.

Für sämtliche Sythetisierungen wurde „Ultrapure“ Wasser (Purelab ultra instrument, ELGA) verwendet. Die Synthetisierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.5.2 Funktionalisierung von CaP Nanopartikeln mit TLR-Liganden, viralen Antigen und Zell-spezifischen Antikörpern

Die Herstellung wurde wie in Kozlova *et al.* 2011 beschrieben durchgeführt. Für die Antikörper-Funktionalisierung wurden Polyethylenimin (PEI) stabilisierte CaP Nanopartikel synthetisiert. Dazu wurden Calciumlaktat (18 mM, Merck)-, Ammoniumhydrogenphosphat (10,8 mM)- und PEI (2 g/l)-Lösungen bei einem Verhältnis von 5 ml : 5 ml : 7 ml in einem zuvor mit 20 ml Ultrapure Wasser

gefüllten Glasgefäß gleichzeitig gemischt. Die PEI-stabilisierten Partikel wurden 20 min bei der RT gerührt und für weitere Beladung mit Biomolekülen oder Funktionalisierung benutzt.

Für die Beladung der positiv geladenen CaP/PEI-Nanopartikel wurden erst 0,13 ml HA (1 mg/ml) zusammen mit 0,52 ml CpG (63 μ M) gemischt. Danach wurde die CpG/HA-Lösung zur 2,6 ml CaP/PEI-Dispersion zugegeben. Die beladenen Partikel wurden 30 min bei Raumtemperatur gerührt und für weitere Funktionalisierung verwendet.

Anschließend folgte die Umhüllung der CaP/PEI/CpG/HA Nanopartikeln mit Siliziumoxid. Dazu wurde zunächst eine Mischung aus 13 ml Ethanol (EtOH; p.a., VWR), 16,3 μ l Tetraethoxysilan (TEOS; 98 %, Sigma-Aldrich) und 9 μ l Ammoniak-Lösung (30-33 %, Carl Roth) dem Stöber Prozess entsprechend vorbereitet (Neumaier et al. 2011, Park et al. 2009 und Ibrahim et al. 2010). Zu dieser Lösung wurden 3,25 ml der CaP/PEI/CpG/HA-Nanopartikel Dispersion unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch rührte anschließend für insgesamt 16 Stunden, bevor das Gemisch für 30 min bei 66000 g ultrazentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und die CaP/PEI/CpG/HA/SiO₂ Nanopartikel in 3,25 ml ultrapure Wasser durch Ultraschall (Sonotrode 7, Zyklus 0,8, Amplitude 70 %, 5 s) redispergiert.

Für die Thiol-Funktionalisierung wurden 3,25 ml der CaP/PEI/CpG/HA/SiO₂-Nanopartikel zu einer Mischung aus 13 ml Ethanol und 16,3 μ l 3-Thiolpropyltrimethoxysilan (MPS; 95 %, Sigma-Aldrich) gegeben. Die Reaktion erfolgte über 8-10 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Suspension unter den gleichen Bedingungen, wie nach der SiO₂-Modifizierung aufgereinigt.

Anschließend wurde der „cross-linker“ sulfo-SMCC (sulfo-SMCC; 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt, p.a., Sigma-Aldrich) für die Konjugation der Thiol-Gruppen von Nanopartikeln mit den Amino-Gruppen von Antikörpern verwendet. Im ersten Schritt wurden 300 μ l der Antikörper (DEC205 oder GL117; 1 mg/ml) mit 150 μ l von dem „cross-linkers“ sulfo-SMCC (4 mM) im PBS zusammengemischt und für 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Reaktionszeit wurden 2,7 ml der CaP/PEI/CpG/HA/SiO₂-SH-Nanopartikel Dispersion dazu gemischt. Die Konjugationsreaktion erfolgte anschließend über 24 Stunden bei 4°C.

Das Reaktionsgemisch wurde für 5 min bei 1000 Upm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und Nanopartikel in 3 ml ultrapure Wasser durch Ultraschall (Sonotrode 7, Zyklus 0.8, Amplitude 70 %, 5 s) redispergiert.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.6.1 Narkotisierung von Mäusen

Für die retroorbitale Blutentnahme sowie Palpation der Milz wurden Mäuse mit Isofluran[®] (Baxter, Unterschleißheim) narkotisiert.

Für die intranasale Infektion mit Influenza A Virus oder Applikation von funktionalisierten CaP Nanopartikeln über die Nase wurden Mäuse mit einer Ketamin/Xylazin-Lösung narkotisiert. Pro 100 mg Körpergewicht wurde 1 µl dieser Narkoselösung IP injiziert.

2.6.2 Blutentnahme

Für die Blutentnahme wurden Mäuse zunächst mit Isofluran[®] narkotisiert. Blut wurde retroorbital mit einer 3 mm heparinisierten Glaskapillare entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem Eppendorfgefäß auf Eis gelagert. Für die Plasmagewinnung wurden 2,5 µl Heparin in die Eppendorfgefäße vorgelegt. Anschließend wurde das Blut für 10 min bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde bei -80°C gelagert.

2.6.3 Organentnahme

Für die Entnahme von verschiedenen Organen wie Milz, Lymphknoten oder Lunge, wurden die Mäuse mittels CO₂ Begasung getötet. Für die Entnahme der Milz wurde die Bauchdecke sowie zu- und abführende Blutgefäße durchtrennt und die Milz mit einer stumpfen Pinzette entnommen. Bis zur Verarbeitung wurde die Milz in kaltem PBS gelagert.

Für die Entnahme der zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten wurde die Maus in Rückenlage aufgespannt. Für die Entnahme der poplitealen Lymphknoten, wurde die Haut nach feinem Einschnitt kurz über dem Fußgelenk

zurückgezogen. Lymphknoten wurden mit einer feinen Pinzette entnommen und in 5 ml FACS-Puffer gelagert.

2.6.4 Immunisierungen

2.6.4.1 Immunisierung gegen Influenza Virus Infektion

Naive BALB/c Mäuse wurden jeweils mit 300 µl PBS, löslichem CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀;HA₅₁₂₋₅₂₀ oder mit CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀;HA₅₁₂₋₅₂₀ funktionalisierten CaP Nanopartikeln an Tag 0, 14 und 28 intraperitoneal immunisiert (65,46 µg/ml CpG, 20,4 µg/ml je HA-Peptid).

Für die intranasale Applikation wurden naive BALB/c Mäuse zuerst mit Ketamin/Xylazin-Lösung narkotisiert und anschließend mit 50 µl PBS, löslichem CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀;HA₅₁₂₋₅₂₀ oder mit CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀;HA₅₁₂₋₅₂₀ funktionalisierten CaP Nanopartikeln an Tag 0, 14 und 28 immunisiert (130,92 µg/ml CpG, 40,8 µg/ml je HA-Peptid).

2.6.4.2 Immunisierung gegen akute Friend Virus Infektion

Naive CB6F1 Mäuse wurden jeweils mit 50 µl PBS, löslichem CpG/gp70₁₂₃₋₁₄₁/GagL₈₅₋₉₃ oder mit CpG/gp70₁₂₃₋₁₄₁/GagL₈₅₋₉₃ funktionalisierten CaP Nanopartikeln an Tag 0 und 14 in die Plantarseite beider Hinterpfoten immunisiert (130,92 µg/ml CpG, 40,8 µg/ml je Peptid).

2.6.4.3 Belastungsinfektionen

2.6.4.3.1 Influenza Virus Infektion

Das Influenza A/PR8/34 Virus wurde von P. Stäheli (Institut für Virologie, Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert und IN mit 1000 „plaque-forming units“ (PFU) des Influenza Virus infiziert. 7 Tage später wurden die Lungen präpariert, homogenisiert und der Virustiter in der Lunge über einen Plaque Assay bestimmt.

2.6.4.3.2 Friend Virus Infektion

Der verwendete FV-Komplex wurde von U. Dittmer (Institut für Virologie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden CB6F1 Mäuse über Injektion in die Schwanzvene mit 500 oder 2500 SFFU („spleen focus forming units“) des FV-Komplexes infiziert. An Tag 10 nach Infektion wurden Mäuse mit Isofluran® narkotisiert, retroorbital Blut entnommen und die Plasmavirämie mit einem „Virämie Assay“ bestimmt. 21 Tage nach der Infektion wurde die Viruslast in der Milz und den Lymphknoten über einen „infectious center Assay“ (IC) bestimmt. C57BL/6 Mäuse wurden mit 45000 SFFU infiziert um eine chronische Infektion zu etablieren.

2.6.4.4 Palpation der Milz

Um den Krankheitsverlauf nach der FV-Infektion zu verfolgen, wurden die Milzen zweimal in der Woche palpiert. Dazu wurden CB6F1 Mäuse mit Isofluran® narkotisiert und die palperten Milzen den Kategorien 1 (leicht bis unveränderte Größe) bis 4 (4 fach vergrößert) zugeordnet.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Dabei erfolgt die Diskriminierung von toten Zellen durch Blaufärbung.

2.7.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.7.2.1 Kultivierung von *NLDC145*- und *GI117*-Zellen

Für die Produktion von α DEC205 Antikörpern (Klon NLDC-145) wurde auf die Hybridomazelllinie NLDC145 zurückgegriffen (Boscardin *et al.* 2006; Swiggard *et al.* 1995). Als Kontrollantikörper wurde GI117 verwendet. Die Kultivierung von NLDC- bzw. GI117- Hybridomazellen erfolgte bis zu einer Zelldichte von 5×10^5

Zellen/ml in 20 ml IMDM Kompletmedium. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert und einmal mit PBS gewaschen und in EX-CELL 610-HSF Serum-freiem Hybridoma Medium aufgenommen. Daraufhin wurden sie bis zu einer Vitalitätsrate von unter 20 % weiter kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 300 g abzentrifugiert und der Überstand aufgefangen. Der Überstand wurde nochmals bei 4000 Upm für 15 min zentrifugiert. Der erhaltene zellfreie Überstand wurde für die Antikörperaufreinigung verwendet.

2.7.2.1.1 Antikörperaufreinigung aus Hybridomaüberständen

Eine immobilisierte Protein G Säule (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) wurde durch Zugabe von 10 ml Protein G Bindepuffer equilibriert. Der Durchfluss wurde verworfen. Hybridomaüberstände wurden im Verhältnis 1:1 mit Protein G Bindepuffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) verdünnt, auf Raumtemperatur gebracht und auf die equilibrierte Protein G Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden erneut 10 ml Protein G Bindepuffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Für die Eluierung des in der Säule gebundenen Antikörpers wurden 10 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss in Eppendorfgefäßen aufgefangen, in die zuvor 100 µl Neutralisationspuffer vorgelegt worden war. Die Antikörperkonzentration im Eluat wurde bei einer Extinktion von 280 nm mit einem Nano Drop 1000 Gerät (Peq Lab) und ND 1000 Software V.3.7.1 gemessen. Um Pufferreste aus den Eluaten zu waschen, wurden die Proben in eine zuvor angefeuchtete „Slide-A-Lyser“ Dialyse Kassette (Thermo Scientific, Rockford, IL) gegeben und über 12 h bei 4°C in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C gelagert.

2.7.2.2 Kultivierung von MDCK-Zellen

Für die Influenza Virusbestimmung wurden „Monolayer“ von Nierenepithelzellen des Hundes kultiviert. Diese MDCK („*Madin Darby canine kidney*“)-Zellen wurden in einer Petrischale in 10 ml DMEM Kompletmedium kultiviert. Für das Verdünnen und Ernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) Lösung abgelöst. Dazu wurden 2 ml Trypsin-EDTA Lösung auf den

Zellrasen gegeben und für 5 bis 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 3 ml DMEM Komplettmedium hinzugegeben und die Zellen in Petrischalen entsprechend verdünnt ausgesät oder auf 12 Loch Zellkulturplatten für den Plaque Assay verteilt.

2.7.2.3 Kultivierung von *Mus dunni*-Zellen

Für den Nachweis FV-infektiöser Zellen wurde die murine Fibroblasten Zelllinie *Mus dunni* kultiviert (Lander and Chattopadhyay 1984). *Mus dunni* Zellen wurden in RPMI Komplettmedium bis zur Verwendung in Zellkulturflaschen kultiviert.

2.7.3 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Für die Durchführung und Analyse von Experimenten, wurden aus verschiedenen lymphatischen Organen Lymphozytensuspensionen hergestellt. Die Zentrifugation der Suspension erfolgte jeweils in einer Zellkulturzentrifuge (Multifuge 3SR+, Thermo Scientific, Langenselbold) für 10 min bei 1200 Upm und 4°C.

2.7.3.1 Milz

Milzen wurden präpariert und mit 10 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (ACK-Puffer) mit einer Kanülenspritze ausgespült und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer oder Zellkulturmedium resuspendiert.

2.7.3.2 Lymphknoten

Während dieser Arbeit wurden verschiedene Lymphknoten für die Gewinnung von Lymphozytensuspensionen präpariert und mit FACS-Puffer durch ein Zellsieb (100 µm, BD Bioscience) gerieben. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und in FACS-Puffer oder Medium resuspendiert.

2.7.4 Isolierung von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen

CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurden aus der Milz unter Verwendung des autoMACS („magnetic cell separation“, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) Separationssystems isoliert. Dafür wurden jeweils das murine „CD4⁺ T Cell

Isolation Kit“ und „CD8⁺ T Cell Isolation Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.7.5 Isolierung von Dendritischen Zellen

Für die Isolierung von Dendritischen Zellen (DC) aus der Milz wurde das Organ in kleine Stücke geschnitten und mit einer Collagenase D/Dnase-Lösung für 45 min bei 37°C inkubiert und darauf folgend durch ein Zellsieb (100 µm, BD Bioscience) gerieben und die Zellsuspension mit ACK-Puffer gewaschen. CD11c⁺ Zellen wurden anschließend unter Anwendung von „CD11c⁺ (N418) Micro Beads“ mit Hilfe des autoMACS Separationssystems über Positivselektion nach Herstellerangaben isoliert.

2.7.6 IFN-γ ELISpot Assay

IFN-γ produzierende Zellen wurden nach *ex vivo* Restimulierung mit einem ELISpotPLUS Kit (MABTECH AB, Nacka Strand, Sweden) detektiert. Dazu wurden 2,5x10⁵ Milz- oder Lymphknotenzellen immunisierter Mäuse mit 5 bis 10 µg/ml der für die Immunsierung eingesetzten Peptide (HA₁₁₀₋₁₂₀, HA₅₁₂₋₅₂₀, gp70₁₂₃₋₁₄₁, Gag_{L85-93}) in einer 96 Loch Zellkulturplatte restimuliert. Nach 24 h wurden IFN-γ produzierende Zellen nach den Angaben des Herstellers gezählt. Anschließend wurde die Anzahl der Spots mit Hilfe der ELISPOT 6.0 Software und einem AID ELISPOT Auslesegerätes ausgezählt.

2.7.7 Durchflusszytometrie

Die Analyse der durch Fluorophor-Antikörper-Konjugate markierten Zellen erfolgte an einem LSR II Durchflusszytometer mit DIVA Software (BD Biosciences, Heidelberg).

Tabelle 2.4: Antikörperkonjugate für die Durchflusszytometrie.

Epitop	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD4	Pacific Blue (PB)	GK1.5	BD Pharmingen
CD8	Pacific Blue (PB)	53-6.7	BD Pharmingen
CD8	Allophycocyanin	53-6.7	BD Pharmingen
CD11c	Allophycocyanin	HL3	BD Pharmingen
CD80	Biotin konjugiert	16-10A1	BD Pharmingen
CD86	Biotin konjugiert	PO3	BD Pharmingen
CD40	FITC	HM40-3	Biolegend
CD43	PeCy7	1B11	Biolegend
MHCII	FITC	2G9	BD Pharmingen
Foxp3	FITC	FJK-16s	eBioscience
Granzym B (anti-human)	Allophycocyanin	GB12	Invitrogen

2.7.7.1 Färbung gegen Oberflächenproteine

Die für die Analyse der Expression spezifischer Oberflächenproteine verwendeten Antikörper waren mit einem Fluorophor oder mit Biotin konjugiert. Für die Färbung wurden individuelle Antikörperverdünnungslösungen in FACS-Puffer eingesetzt. Zellen wurden in 96 Loch Rundbodenzellkulturplatten überführt und für 5 min bei 4°C und 1200 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und jeweils mit 100 µl Antikörperlösung bei 4°C für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch zugeben von 100 µl FACS Puffer verdünnt und für 5 min bei 4°C und 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in mindestens 200 µl FACS Puffer für die Messung resuspendiert. Bei Verwendung von Biotin konjugierten Antikörpern erfolgte ein sekundärer Färbeschritt, bei dem zur Markierung ein Streptavidin konjugiertes PE (Phycoerythin) eingesetzt wurde.

2.7.7.2 Multimer Färbung

Für die durchflusszytometrische Detektion von Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden Pentamer-(HA₅₁₂₋₅₂₀; Proimmune, Oxford, UK) bzw. Tetramer-Moleküle (GagL₈₅₋₉₃; wurde von U. Dittmer (Institut für Virologie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt) verwendet. Diese bestehen aus fünf bzw. vier Peptid-MHCI

Komplexen, die kovalent miteinander verknüpft und mit einem Fluorophor konjugiert sind. Die Tetramer Färbung wurde gleichzeitig mit der Färbung der Oberflächenproteine durchgeführt. Die Pentamer Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.7.7.3 Intrazelluläre Färbung von Foxp3 und Granzym B

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen im Anschluss an die Oberflächenfärbung zweimal mit PBS unter zentrifugieren gewaschen und anschließend mit 100 µl Fix/Perm-Lösung (eBioscience) für 2 Stunden (Foxp3) bzw. 30 Minuten (Granzym B) bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die anschließend permeabilisierten Zellen wurden zweimal mit 100 µl 1x Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen und für 30 Minuten mit dem entsprechenden Antikörper bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen und abschließend für die Messung in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.7.8 „Cell Proliferation Dye“ eFluor670®-Markierung von Lymphozyten

Über die Markierung von Lymphozyten mit dem Proliferationsfarbstoff CDP eFluor670® („Cell Proliferation Dye“, eBioscience) ist es möglich die Proliferation von Lymphozyten durchflusszytometrisch zu verfolgen. Dabei beruht das Prinzip darauf, dass die markierten und sich gegebenenfalls teilenden Zellen die Hälfte des Farbstoffes auf die hervorgehende Tochterzelle übertragen. Dadurch ergibt sich für jede Tochtergeneration eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um die Hälfte. Die Markierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.9 Proliferationstests

2.7.9.1 Proliferationstest *in vitro*

Um den Nachweis zu erbringen, dass das eingeschlossene Antigen nach Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch Antigen-präsentierende

Zellen präsentiert wird, wurden Kokulturen von DCs mit Antigen-spezifischen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen angesetzt.

DCs wurden wie beschrieben aus naiven BALB/c Mäusen isoliert und jeweils 1×10^5 Zellen pro Loch in einer 48-Loch Zellkulturplatte in 400 µl IMDM Komplettmedium für 24 h mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln (CaP/CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀, CaP/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀ oder CaP/CpG/HA₅₁₂₋₅₂₀) oder löslichen TLR-Liganden stimuliert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und gewaschen. Daraufhin wurden im Verhältnis 1:10 1×10^4 DCs mit 1×10^5 eFluor670[®] markierten HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) oder eFluor670[®] markierten HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (CL4-TCR) pro Loch einer 96-Loch Flachbodenplatte für 48 bis 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert.

Für die durchflusszytometrische Auswertung der Zellproliferation wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8 gefärbt und die Abnahme von eFluor670[®] detektiert.

2.7.9.2 Proliferationstest *in vivo*

Für den Nachweis der Ag-spezifischen T-Zellaktivierung nach CaP Nanopartikel Behandlung wurden 1×10^7 HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) oder 5×10^5 HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen (CL4-TCR) mit eFluor670[®] markiert und adoptiv mittels einer Einmal-Feindosierungsspritze (0,3x12 mm, B. Braun Petzold GmbH) über die Schwanzvene in naive BALB/c Mäuse transferiert. An Tag 1 und 2 wurden die Mäuse mit 150 µl (IP Injektion) oder 50 µl (IN Applikation) funktionalisierten CaP Nanopartikeln behandelt (CaP/CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀ oder CaP/CpG/HA₅₁₂₋₅₂₀). Als Vergleichskontrolle diente die Injektion von löslichem CpG und dem jeweiligen Peptid. An Tag 4 wurden die Lymphozyten gegen die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8 gefärbt und die Abnahme von eFluor670[®] detektiert.

2.7.10 Bestimmung von sezernierten Zytokinen

DCs wurden wie beschrieben aus naiven BALB/c Mäusen isoliert und jeweils 5×10^5 Zellen pro Loch in einer 48-Loch Zellkulturplatte in 400 µl IMDM Komplettmedium für 24 h mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln

(CaP/CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀, CaP/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀ oder CaP/CpG/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀) oder löslichen TLR-Liganden stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden daraufhin mit Hilfe des „Procarta Cytokine Assay Kit“ (Panomics, Fremont, USA) an einem Luminex200 Gerät mit Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA) nach Angaben des Herstellers in den Zellkulturüberständen bestimmt.

2.7.11 Aufnahmestudien von funktionalisierten CaP Nanopartikeln

2.7.11.1 Aufnahmenachweis *in vitro*

Für den Nachweis der Nanopartikel Aufnahme durch DCs innerhalb einer Milzzellkultur wurden Milzzellen wie beschrieben isoliert und 1×10^6 Zellen pro Loch einer 48-Loch Zellkulturplatte für 24 h mit 40 μ l CpG^{Alexa488} funktionalisierten CaP Nanopartikeln in insgesamt 400 μ l IMDM Komplettmedium bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen, um anheftende CaP Nanopartikel zu entfernen und gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, CD80 und CD86 mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Der Anteil Alexa Fluor 488-positiver DCs wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Für den Nachweis der *in vitro* Aktivierung von APCs nach Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln wurden DCs wie beschrieben isoliert und jeweils 5×10^5 Zellen in 400 μ l IMDM Komplettmedium pro Loch einer 48-Loch Zellkulturplatte mit 40 μ l funktionalisierten CaP Nanopartikeln (CaP/CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀, CaP/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀ oder CaP/CpG/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀) oder den löslichen Äquivalenten für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ stimuliert.

Anschließend wurden die Zellen geerntet, mehrfach gewaschen um anheftende CaP Nanopartikel zu entfernen und mit Ag-spezifischen T-Zellen kokultiviert (Punkt 3.2.1) oder mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, sowie CD80, CD86, CD40 und MHCII gefärbt.

Für die Visualisierung der Aufnahme über konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurden DCs wie beschrieben isoliert und 5×10^5 Zellen in 500 μ l IMDM Komplettmedium pro Loch einer 48-Loch Zellkulturplatte mit 40 μ l TRITC-BSA funktionalisierten CaP Nanopartikeln über 3, 5 oder 7 h inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen geerntet und mehrfach gewaschen, um anheftende CaP Nanopartikel zu entfernen. Darauf folgte die mikroskopische Untersuchung (Zeiss LSM510, Axiovert200). Für die Untersuchung der für 48 h inkubierten Zellen wurden die Zellen wie beschrieben mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln für 7 h inkubiert, Medium und Nanopartikelrückstände entfernt und die Zellen für weitere 48 h mit IMDM Kompletmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen, mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt und mikroskopisch untersucht.

2.7.11.2 Aufnahmenachweis *in vivo*

Für den Nachweis der Aufnahme von CaP Nanopartikeln durch CD11c⁺ DCs nach IP Injektion wurden 600 µl mit CpG^{Alexa488} funktionalisierter CaP Nanopartikel in naive BALB/c Mäuse injiziert. Nach 4 h Stunden wurden die Milzen präpariert, Milzzellen wie beschrieben isoliert und gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, CD80 und CD86 gefärbt. Der Anteil Alexa Fluor 488 positiver DCs wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Für den Nachweis der Aufnahme von CaP Nanopartikeln durch CD11c⁺ DCs nach IN Applikation wurden naive BALB/c Mäuse mit Ketamin/Xylazin betäubt und 50 µl mit CpG^{Alexa488} funktionalisierter CaP Nanopartikel intranasal verabreicht. Nach 4 h wurden Lungenlymphknoten präpariert und gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, CD80 und CD86 gefärbt. Der Anteil Alexa Fluor 488 positiver DCs wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

2.7.12 Bestimmung der Viruslast

2.7.12.1 Bestimmung des Influenza Virustiters in der Lunge mittels Plaque Assay

Zunächst wurden pro Loch einer 12 Loch Zellkulturplatte 5×10^5 MDCK Zellen in 1 ml DMEM Kompletmedium ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die Lungen präpariert und in 800 µl eiskaltes PBS mit 0,3 % BSA homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat für 8 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Eine Verdünnungsreihe der Überstände wurde in 24 Loch Zellkulturplatten mit 0,3 % BSA enthaltendem OptiMem Medium (Gibco) angesetzt. Die vorbereiteten MDCK-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen

und die verdünnten Proben anschließend überführt. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurden die Überstände entfernt und 2 ml DMEM Kompletmedium, mit 0,2 µg/ml Trypsin (Sigma Aldrich, USA), 50 µg/ml Gentamicin (PAA Laboratories, Österreich) und 3 % Avicel (FMC BioPolymer, Philadelphia, PA) vorsichtig hinzugegeben. Die Zellen wurden 4 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag 4 wurde der Überstand entfernt und MDCK-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Roth, Karlsruhe) für 30 min fixiert. Plaques im Zellrasen wurden nach 10 min Färbung mit Kristallviolett (Roth, Karlsruhe) sichtbar gemacht. Aus dem Mittelwert der Anzahl an Plaques aus der Verdünnungsreihe wurde die Plaqueanzahl pro Lunge (PFU/Lunge) berechnet.

2.7.12.2 Bestimmung infektiöser Zellen nach Friend Virus Infektion im IC-Assay

Einen Tag vor dem Nachweis der Viruslast wurden 2×10^4 *Mus dunni* Zellen pro Loch einer 6 Loch Zellkulturplatte in 3 ml RPMI Kompletmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurden Milzen oder Lymphknoten präpariert, durch ein Zellsieb (70 µm) gerieben und die Zellsuspensionen mit 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension ausgehend wurden zehnfach Verdünnungsreihen angefertigt, von denen jeweils 1 ml auf die *Mus dunni* Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden drei bis vier Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 95 % Ethanol fixiert. Ethanolreste wurden durch mehrfaches waschen mit PBS mit 0,1 % BSA entfernt. Pro Loch wurden 700 µl Hybridomaüberstandes des Primärantikörpers AK720 auf die Zellen gegeben und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überstände wurden entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (+ 0,1 % BSA) gewaschen. Der Sekundärantikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05 mol/l) wurde in PBS (+0.1 % BSA) verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und pro Loch 2 ml AEC Substratlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Substratlösung wurde entfernt und die Zellen mit H₂O gewaschen. Aus dem Mittelwert der Anzahl an Foci pro Verdünnungsstufe und der Gesamtanzahl der Milz- oder Lymphknotenzellen wurde die Anzahl infektiöser Zellen pro Organ berechnet.

2.7.12.3 Bestimmung der Plasma-Virämie

Einen Tag vor dem Nachweis der Plasma-Virämie wurden $7,5 \times 10^3$ *Mus dunni* Zellen pro Loch einer 24 Loch Zellkulturplatte in 500 µl RPMI Komplettmedium ausgesät. Zur Bestimmung der Virämie wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und dieses 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Mit dem gewonnenen Plasma wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS in einer 96 Loch Zellkulturplatte angesetzt. 1 Stunde bevor 50 µl der verdünnten Plasmaproben auf die vorbereiteten *Mus dunni* Zellen überführt wurden, wurden 25 µl Polybren (80 µg/ml) zu der Zellkultur gegeben. Die Zellen wurden drei bis vier Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 95 % Ethanol fixiert. Ethanolreste wurden durch mehrfaches waschen mit PBS mit 0,1 % BSA entfernt. Pro Loch wurden 200 µl Hybridomaüberstandes des Primärantikörpers AK720 auf die Zellen gegeben und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überstände wurden entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (+ 0,1 % BSA) gewaschen. Der Sekundärantikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05 mol/l) wurde in PBS (+ 0,1 % BSA) verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und pro Loch 2 ml AEC Substratlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Substratlösung wurde entfernt und die Zellen mit H₂O gewaschen. Aus dem Mittelwert der Anzahl an Foci pro Verdünnungsstufe wurde die Anzahl der Fokus-bildenden Einheiten („focus forming units“, FFU) pro ml berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Funktionalisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems

In Kooperation mit dem Institut für Anorganische Chemie und Nanointegration der Universität Duisburg-Essen wurden mehrschalige CaP Nanopartikel hergestellt. Der Kern besteht aus Calciumphosphat, der mit den Toll-like Rezeptor Liganden CpG (TLR9) und/oder poly(I:C) (TLR3) sowie einem 11 Aminosäure langem MHCII restringiertem Antigen aus dem HA-Protein des Influenza A Virus (HA₁₁₀₋₁₂₀; FERFEIFPKES) funktionalisiert ist. Eine weitere Schicht CaP und Liganden umhüllen diesen Kern, um ihn vor frühzeitigem Abbau zu schützen. Das Konzept der Funktionalisierung ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

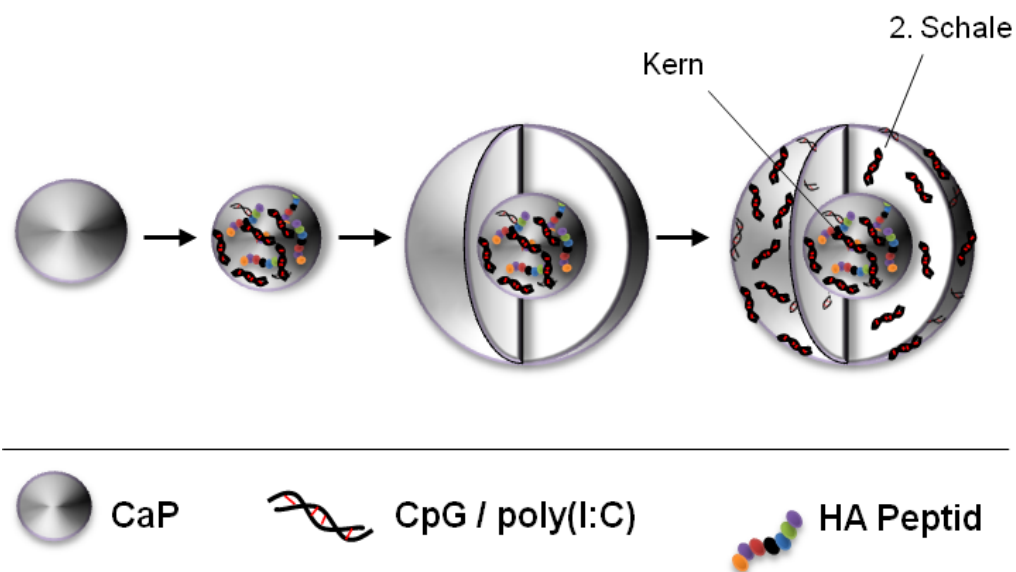


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Herstellungs- und Funktionalisierungsprozesses von mehrschaligen CaP Nanopartikeln funktionalisiert mit TLR-Liganden und HA-Peptid. Durch schnelles Mischen einer Calciumnitrat und di-Ammoniumphosphat Lösung entsteht ein kolloider CaP Kern. Zur Stabilisierung werden die TLR-Liganden CpG und/oder poly(I:C) sowie ein virales Peptid hinzugefügt. Durch weiteres Hinzugeben von Calciumnitrat, di-Ammoniumphosphat und TLR-Liganden wird der Kern mehrschalig umhüllt.

Die durchschnittliche Größe wurde mittels dynamischer Lichtstreuung und Brownscher Bewegungsanalyse bestimmt. Der Durchmesser eines Nanopartikels

lag zwischen 200 und 300 nm (Tab. 3.1). Eine negative Oberflächenladung der Nanopartikel (zeta-Potential) bestätigte zudem die Assoziation der negativ geladenen Oligonucleotide CpG und/oder poly(I:C) mit den CaP Nanopartikeln (ca. -25 mV). Abbildung 3.2 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen und bestätigt eine homogene Größe der Nanopartikel (Abb. 3.2).

Tabelle 3.1: Größenanalyse der verschiedenen mehrschaligen CaP Nanopartikeln. (Veröffentlicht in Sokolova *et al.* 2010)

TLR-Ligand	Antigen	Durchmesser/nm	Zeta Potential/mV
CpG	-	178	-25
CpG	HA ₁₁₀₋₁₂₀	219	-28
poly(I:C)	-	177	-27
poly(I:C)	HA ₁₁₀₋₁₂₀	259	-23
CpG/poly(I:C)	-	159	-26
CpG/poly(I:C)	HA ₁₁₀₋₁₂₀	263	-23

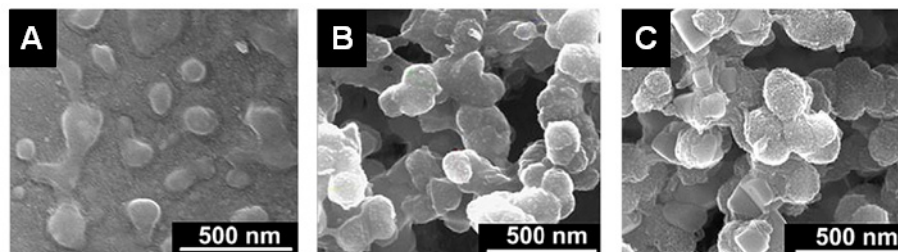


Abbildung 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen mehrschaliger funktionalisierter Nanopartikel. Mehrschalige CaP Nanopartikel wurden durch schnelles Mischen von Calciumnitrat und di-Ammoniumphosphat Lösung unter Zugabe von TLR-Liganden und HA Peptid in einem Mehrschrittprozess hergestellt (s.Abb.3.1) und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. A) CaP/CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀ B) CaP/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀ C) CaP/CpG/poly(I:C)/HA₁₁₀₋₁₂₀. (Veröffentlicht in Sokolova *et al.* 2010)

3.2 In vitro Aktivierung des Immunsystems

3.2.1 Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch DCs

Da TLR3 und TLR9 endosomal lokalisiert sind und sowohl Prozessierung als auch Präsentation des in den CaP Nanopartikeln verpackten Antigens über die

endosomalen Kompartimente stattfindet, stellte die Aufnahme funktionalisierter Nanopartikel durch APCs die grundsätzliche Voraussetzung für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems dar. DCs gelten als die effektivsten APCs und spielen in der Induktion von T-Zell vermittelten Immunantworten eine wichtige Rolle. Sie stellen daher ein wichtiges Ziel bei der Impfstoffentwicklung dar (Hart 1997). Um die Aufnahme von CaP Nanopartikeln durch DCs nachzuweisen, wurden CaP Nanopartikel mit CpG und fluoreszierendem BSA (bovines Serum Albumin; TRITC-BSA) funktionalisiert, reine primäre Milz DC Kulturen mit diesen Nanopartikeln inkubiert und die Aufnahme über 3, 5, 7 und 48 Stunden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt. Schon nach 3 Stunden Inkubationszeit konnten DCs nachgewiesen werden, die das Signal der fluoreszierenden CaP Nanopartikel zeigten (Abb. 3.3). Fokussierungen durch mehrere Ebenen der Zellen während der Aufnahme bestätigten zudem die Lokalisation der CaP Nanopartikel im Zytoplasma. Während bis 7 Stunden nach Inkubationsstart klare partikuläre Strukturen innerhalb der DCs zu finden waren, war 48 Stunden später eine homogenere Verteilung des roten Fluoreszenzfarbstoffes in der Zelle erkennbar, was auf einen fortgeschrittenen Abbau der CaP Nanopartikel durch das Endosom hindeutete.

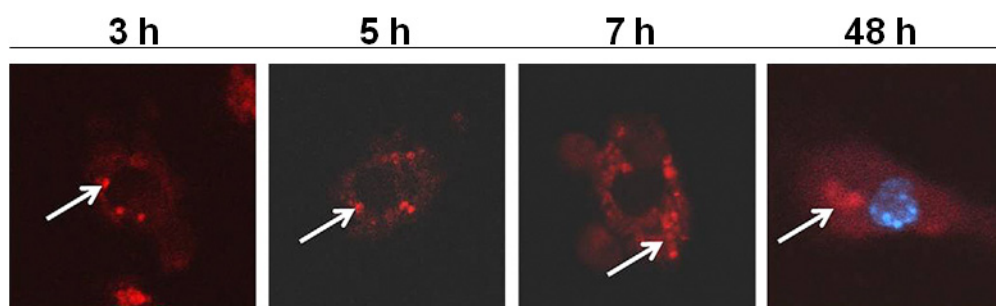


Abbildung 3.3: Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel durch DCs. DCs wurden aus der Milz naiver BALB/c Mäuse isoliert und über mehrere Stunden (h) mit CaP/CpG/TRITC-BSA Nanopartikeln inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt (48 h, blau). (Veröffentlicht in Sokolova *et al.* 2010)

Nach der Aufnahme von pathogenem Material werden PAMPs erkannt und die DC beginnt zu reifen. Dieser Prozess ist wichtig, um mit T-Zellen in Kontakt zu treten und diese zu aktivieren. Reife DCs regulieren wichtige kostimulatorische

Oberflächenmoleküle wie CD80, CD86 aber auch MHCII herauf (Banchereau *et al.* 2000). Um zu überprüfen, ob dieser Reifungsprozess ebenfalls nach Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln ausgelöst wird, wurden DCs aus der Milz isoliert und für 24 Stunden mit CaP Nanopartikeln stimuliert, die mit CpG und/oder poly(I:C) sowie dem viralen HA₁₁₀₋₁₂₀-Antigen funktionalisiert wurden (CaP/CpG/HA; CaP/poly(I:C)/HA; CaP/CpG/poly(I:C)/HA). Um die Effektivität beider Stimulationsmethoden auf die Reifung zu vergleichen, wurden DCs mit löslichen TLR-Liganden und HA₁₁₀₋₁₂₀-Peptid stimuliert (CpG/HA; poly(I:C)/HA; CpG/poly(I:C)/HA). Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3.4 A). Dabei stellte sich heraus, dass die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle nach Stimulation gesteigert werden konnte, wobei DCs, die mit CpG und/oder poly(I:C) funktionalisierten CaP Nanopartikeln stimuliert wurden, die stärkste Expression zeigten. Durch die gemeinsame Verwendung von CpG und poly(I:C) bei der Nanopartikel Funktionalisierung konnte diese Expression jedoch nicht gesteigert werden, so dass sich die einzelne Verwendung eines Liganden am effektivsten für die Reifung von DCs herausstellte.

Neben der erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle ist auch die Produktion und Sekretion inflammatorischer Zytokine ein Zeichen für die Zellreifung. Reife DCs sezernieren wichtige pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-12 oder auch TNF- α , die während einer Immunantwort Einfluss auf T-Zellen und Makrophagen nehmen (Keene *et al.* 1985, Mosmann *et al.* 1989, Abbas *et al.* 1996). Deshalb wurde der Zellkulturüberstand zusätzlich die Konzentration verschiedener Zytokine mittels Luminex Technologie bestimmt. Es wurden deutlich erhöhte Konzentrationen von IL-12, IL-2 und TNF- α detektiert (Abb. 3.4 B). Somit konnte in den ersten Experimenten sowohl mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch eine Aufnahme funktionalisierter Nanopartikel durch DCs und der effektivere Transport von TLR-Liganden anhand der Zellreifung bzw. -aktivierung nachgewiesen werden.

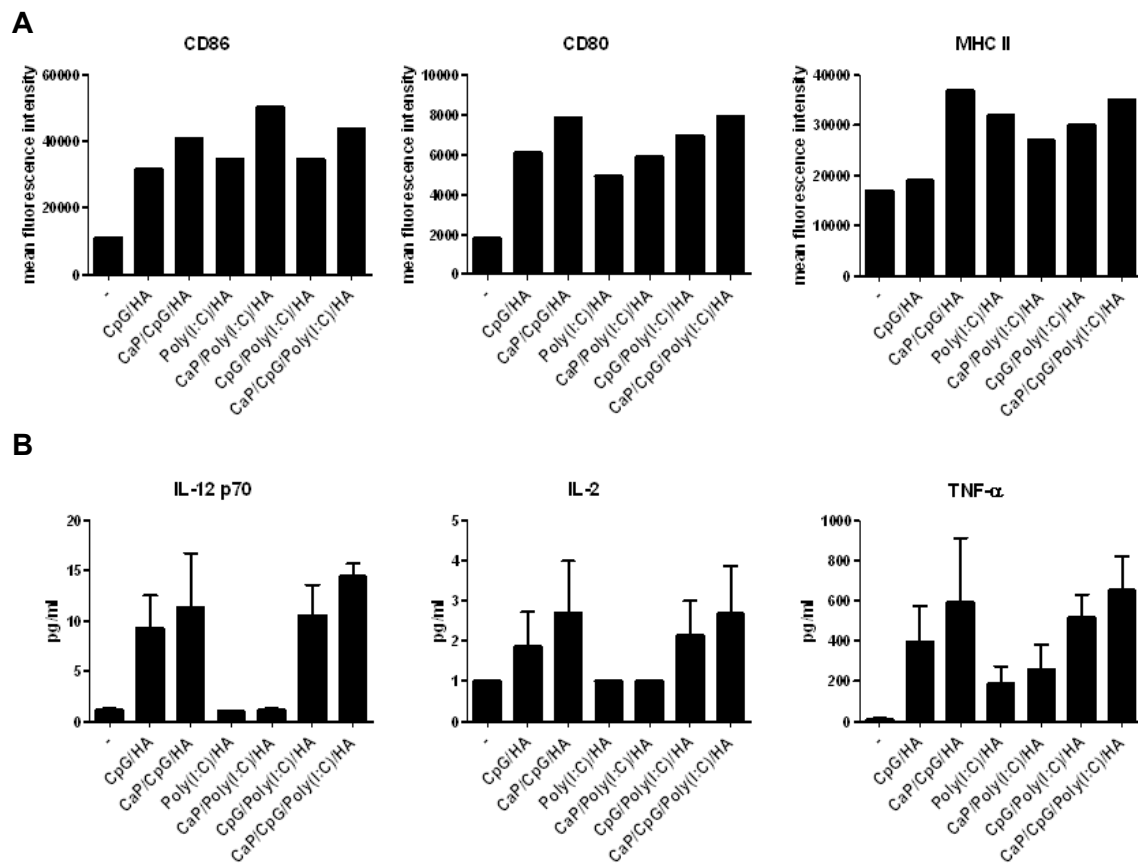


Abbildung 3.4: DC Reifung nach Stimulation mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln. DCs wurden aus der Maus Milz isoliert und für 24 Stunden mit CpG und/oder poly(I:C) sowie HA₁₁₀₋₁₂₀ funktionalisierten Nanopartikeln oder löslichen Faktoren *in vitro* stimuliert. A) Anschließend wurden die Zellen geerntet und auf das DC Oberflächenmolekül CD11c sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie MHCII Molekül gefärbt und deren Expression mittels durchschnittlicher Fluoreszenzintensität ermittelt („mean fluorescence intensity“, MFI). B) Konzentrationen der Zytokine IL-12, IL-2 und TNF- α wurden mithilfe der Luminex Technologie in Zellkulturüberständen 24 h nach Stimulation gemessen. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM). (veröffentlicht in Sokolova *et al.* 2010)

Während die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel durch DCs in einer reinen DC-Kultur zeigte, sollte anschließend die Aufnahmeeffizienz durch DCs innerhalb einer Gesamt-Milzzellpopulation untersucht werden. Dafür wurden CaP Nanopartikel mit CpG funktionalisiert, die zusätzlich das Fluorophor Alexa Fluor 488 enthielten.

Nach 24 Stunden Stimulation wurde der prozentuale Anteil Nanopartikel positiver DCs durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.5 A). 37,2 % der DCs zeigten dabei das fluoreszierende Signal der Nanopartikel und damit eine Assoziation mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln. Diese Zellen zeigten eine Erhöhung der Expression von CD80 und CD86 (Abb. 3.5 B).

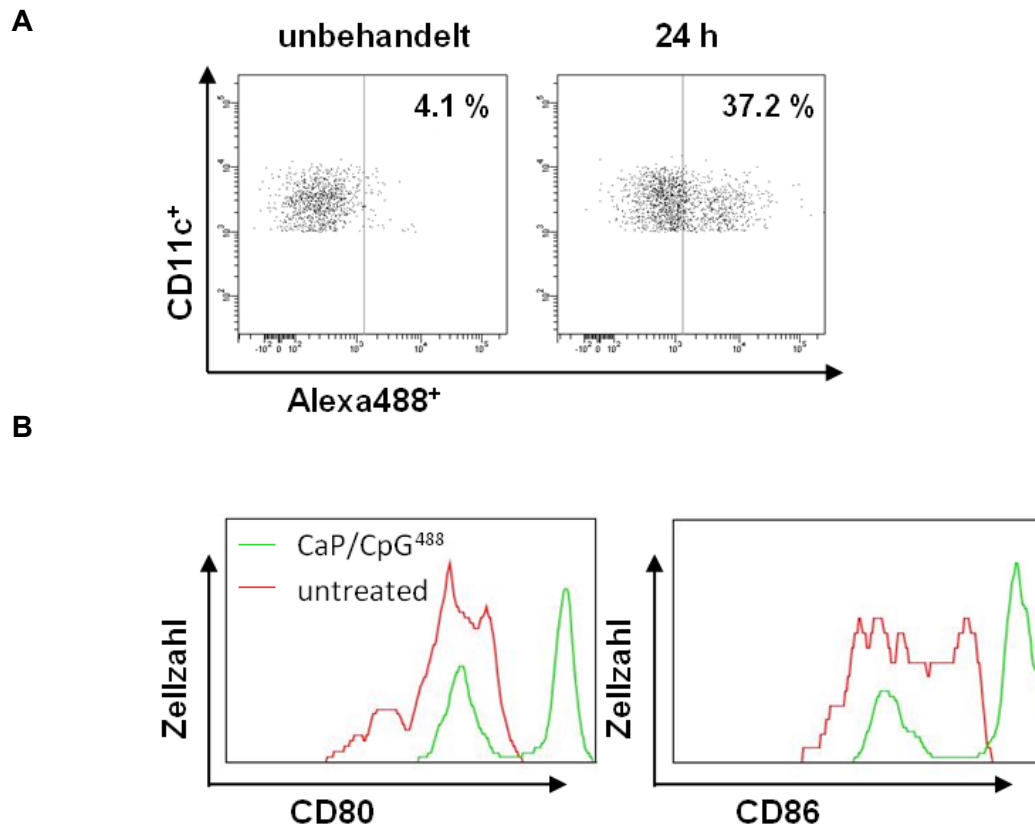


Abbildung 3.5: Aufnahme von CaP Nanopartikeln und Reifung von DCs. Milzzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit CaP/CpG^{Alexa488} Nanopartikeln stimuliert. Anschließend wurden diese Milzzellen mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, CD80 und CD86 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. A) Effektive Aufnahme der CaP Nanopartikel durch CD11c⁺ Zellen. B) Erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Einige partikuläre Strukturen sind auch ohne PAMPs in der Lage, Zellen des angeborenen Immunsystems zu aktivieren (De Geest *et al.* 2012). Um auszuschließen, dass die Aktivierung von APCs auf die partikuläre Struktur oder das Calciumphosphat an sich zurückzuführen ist, wurden CaP Nanopartikel hergestellt, bei denen statt des TLR-Liganden CpG, nicht immunogene Oligonucleotidsequenzen (Oligo) für die Stabilisierung verwendet wurden. DCs wurden mit CaP/Oligo/HA oder herkömmlichen CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀ funktionalisierten CaP Nanopartikeln (CaP/CpG/HA) stimuliert und erneut die Expression kostimulatorischer Moleküle bestimmt. Interessanterweise konnten nur dann Effekte detektiert werden, wenn die Ansätze CpG enthielten (Abb. 3.6 A). Dies traf auch auf die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-12 und TNF- α zu (Abb. 3.6 B). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass nicht die partikuläre Struktur der Nanopartikel oder das Calciumphosphat für die Aktivierung der DCs verantwortlich ist, sondern der zur Funktionalisierung verwendete TLR-Ligand.

Dieses Ergebnis konnte anschließend mit DCs bestätigt werden, denen die TLRs 3, 7 und 9 fehlten (TLR3^{-/-}7^{-/-}9^{-/-}). Auch hier war keine effektive Expressionserhöhung der Moleküle CD86 und CD40 sowie MHCII nach 24 Stunden *in vitro* Stimulation zu detektieren (Abb. 3.7).

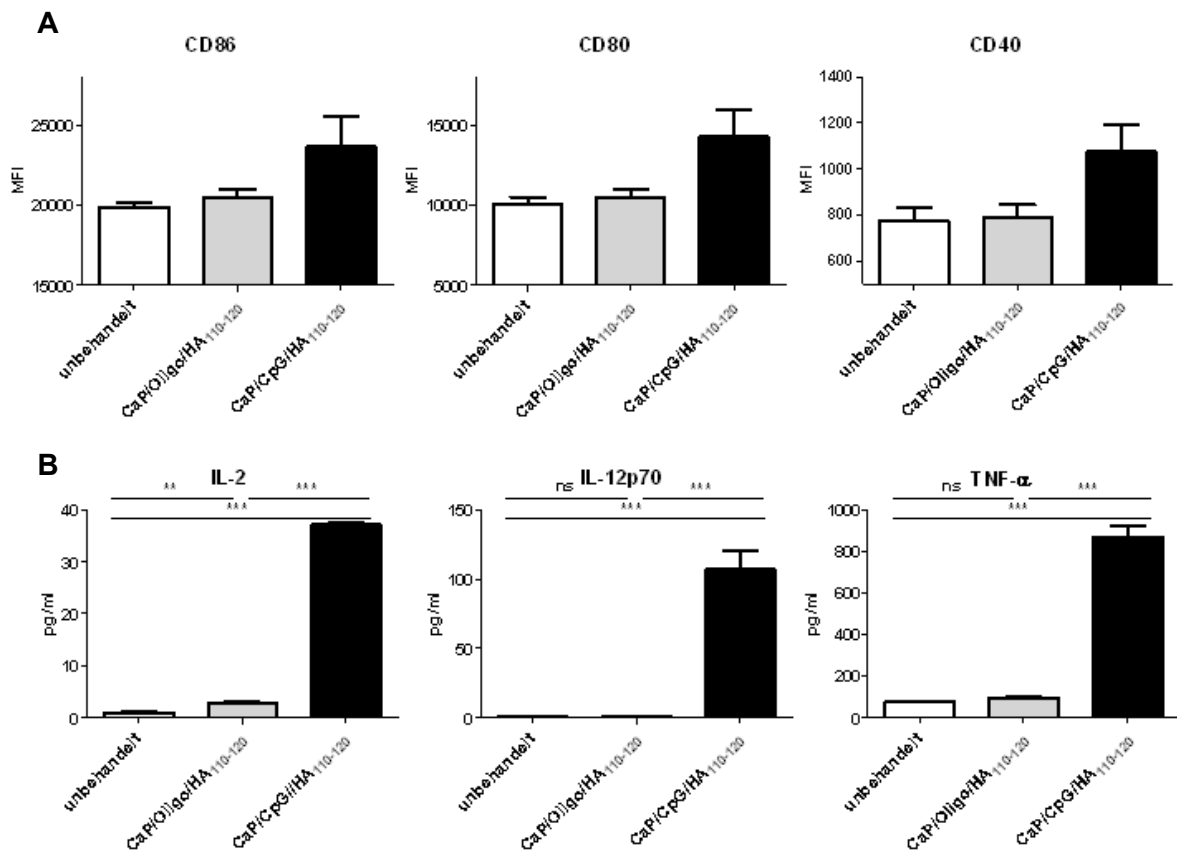


Abbildung 3.6: Induktion von DC Reifung wird durch den TLR-Ligand CpG in funktionalisierten CaP Nanopartikeln vermittelt. DCs wurden aus der Milz isoliert und für 24 h mit CaP Nanopartikeln behandelt, die entweder mit CpG und HA₁₁₀₋₁₂₀ oder irrelevanten Oligonucleotidsequenzen und HA₁₁₀₋₁₂₀ funktionalisiert waren. A) Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf CD11c⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. B) Zytokinkonzentrationen wurden 24 h nach Stimulation im Überstand der DC Kulturen mittels Luminex Technologie gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Gezeigt ist die Zusammenfassung der Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

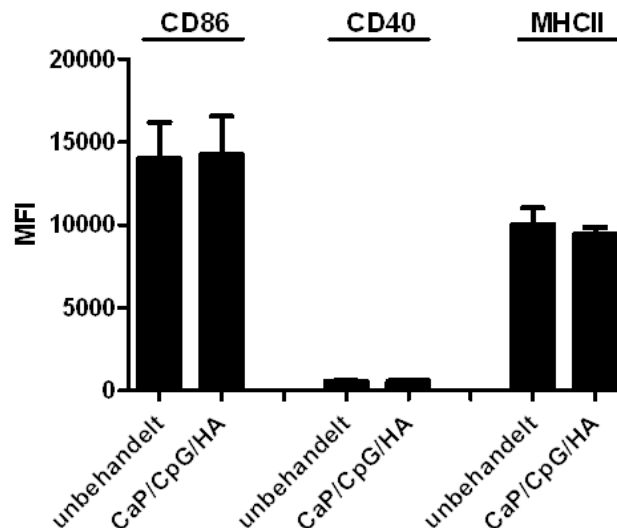


Abbildung 3.7: Keine Induktion von DC Reifung in TLR KO Mäusen durch CpG funktionalisierte CaP Nanopartikel. DCs wurden aus transgenen TLR KO (Knock out) Mäusen mit C57/BL6 Hintergrund ($TLR3^{-/-}7^{-/-}9^{-/-}$) isoliert und 24 h mit CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀ funktionalisierten Nanopartikeln stimuliert. Die Expression der Moleküle CD86, CD40 und MHCII auf CD11c⁺ Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Gezeigt ist die Zusammenfassung der Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellantworten durch DCs nach Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel

Für die effektive Induktion von T-Zellantworten muss das während des Herstellungsprozesses eingeschlossene HA-Peptid sicher im endosomalen Kompartiment einer APC ankommen, um den Prozess der Antigenprozessierung und -präsentation zu durchlaufen. Nur dann kann die aktivierte APC Antigen-spezifische T-Zellantworten induzieren. Um die erfolgreiche Präsentation des verpackten HA-Peptids nach Aufnahme der funktionalisierten CaP Nanopartikel durch DCs zu überprüfen, wurden DCs stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die DCs geerntet und für weitere 72 Stunden mit eFluor[®]670 gefärbten HA₁₁₀₋₁₂₀ spezifischen CD4⁺ T-Zellen inkubiert. Anhand der Abnahme der Fluoreszenzintensität des eFluor[®] Farbstoffes wurde die Proliferation der T-Zellen bestimmt (Abb. 3.8). Die Stimulation von DCs mit der löslichen Form des HA₁₁₀₋₁₂₀ Peptids führte zu einer durchschnittlichen Proliferation von 10,9 % der Ag-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Verglichen dazu konnten die Proliferationswerte der CD4⁺ T-Zellen durch Stimulation von DCs mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln deutlich gesteigert werden (mind. 16,6 %). Besonders CaP Nanopartikel, die neben dem HA₁₁₀₋₁₂₀ Peptid auch den TLR-Liganden CpG trugen, induzierten eine

bessere DC Aktivierung mit erfolgreicher Präsentation des Antigens, die im Vergleich zur HA₁₁₀₋₁₂₀-Peptid Kontrolle eine signifikant höhere Proliferation induzierte (** $p < 0.01$). Dieses Experiment zeigte, dass das verpackte virale Antigen erfolgreich zu DCs transportiert und von diesen anschließend effektiv präsentiert wird.

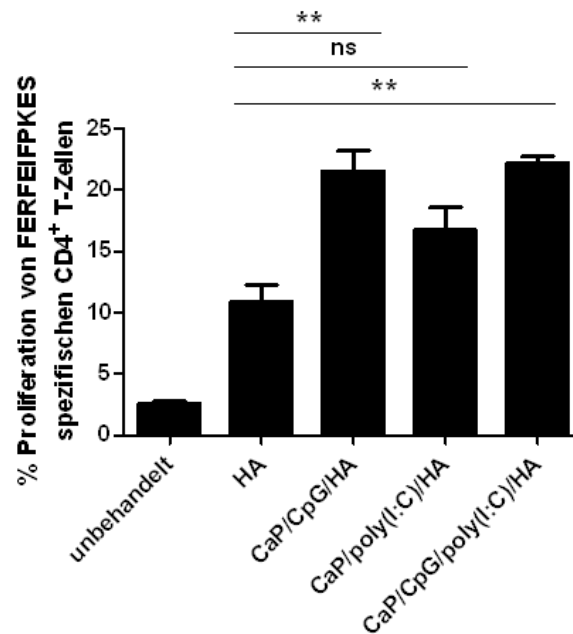


Abbildung 3.8: Induktion einer T-Zellantwort durch CaP Nanopartikel stimulierte DCs. DCs wurden 24 Stunden mit funktionalisierten Nanopartikeln oder HA₁₁₀₋₁₂₀-Peptid stimuliert. Anschließend wurden DCs geerntet und für weitere 72 Stunden mit Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert. Durch den Verlust des Proliferationsfarbstoffes eFluor[®] wurde die Proliferation gemessen. Gezeigt ist die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (** $p < 0.01$). (Veröffentlicht in Sokolova *et al.* 2010)

Wie unter Punkt 1.1 bereits beschrieben werden exogen aufgenommene Antigene mittels MHCII Molekülen präsentiert und induzieren CD4⁺ T_H-Antworten. Für die Induktion von CD8⁺ CTL Antworten muss das Antigen in der Regel intrazellulär in der APC vorliegen, um nach Prozessierung mit einem MHCI Molekül assoziiert und den CD8⁺ CTLs präsentiert zu werden (Williams *et al.* 2002). Dies ist zum Beispiel bei Viren oder intrazellulären Bakterien der Fall, deren Bestandteile nach Infektion der APC auf deren MHCI Molekülen präsentiert werden. Allerdings ist

durch den sogenannten Prozess der Kreuzpräsentation auch die Präsentation von extrazellulärem Material auf MHCI Molekülen möglich (Heath *et al.* 2004, Kurts *et al.* 2010). Da eine erfolgreiche Kreuzpräsentation des verpackten Antigens in den CaP Nanopartikeln für die Induktion einer Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort essentiell ist, und CaP Nanopartikel zudem eine Art „Mimikry“ eines extrazellulären Pathogens darstellen, wurde als nächstes überprüft, ob durch die Funktionalisierung von CaP Nanopartikeln mit einem MHCI-restringiertem Antigen eine CD8⁺ T-Zellantwort induziert werden kann. Dafür wurde ein MHCI restringiertes HA-Peptid (HA₅₁₂₋₅₂₀; IYSTVASSL) für die Funktionalisierung der Nanopartikel verwendet. Zusätzlich wurden die Nanopartikel mit CpG beladen und für 24 Stunden mit DCs inkubiert. Als Vergleich wurden die löslichen Faktoren CpG und HA₅₁₂₋₅₂₀ eingesetzt. Anschließend wurden die behandelten DCs mit HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Nach 48 Stunden Kokultur wurde die Proliferation der HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der Abnahme des Proliferationsfarbstoff eFluor[®]670 im Durchflusszytometer gemessen. Ähnlich wie in 3.2.2 waren Nanopartikel behandelte DCs in der Lage Ag-spezifische CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu aktivieren, so dass es zu erfolgreicher Kreuzpräsentation des verpackten HA₅₁₂₋₅₂₀ Peptids kommt (Abb. 3.9).

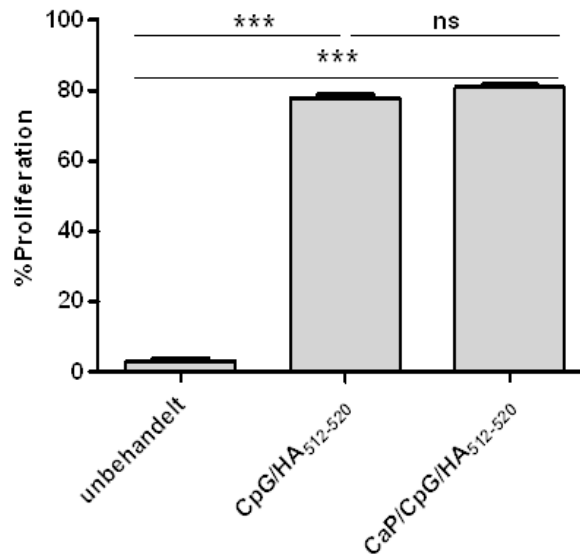


Abbildung 3.9: Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort durch CaP Nanopartikel aktivierte DCs. CD11c⁺ Zellen wurden aus der Milz isoliert und 24 h mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln oder löslichen Faktoren stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für 48 Stunden mit Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Die Proliferation wurde anhand der Abnahme von eFluor[®]670 durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni’s multiple comparisons test“ durchgeführt (** $p < 0.01$). Gezeigt ist die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

3.3 *In vivo* Aktivierung des Immunsystems

3.3.1 Aufnahme von CaP Nanopartikeln über verschiedene Applikationswege *in vivo*

Bisher konnte die Aufnahme von CaP Nanopartikeln durch DCs erfolgreich *in vitro* gezeigt werden. Für die Etablierung als alternatives Immunisierungsvehikel müssen CaP Nanopartikel allerdings auch effizient *in vivo* aufgenommen werden und DCs aktivieren um schließlich Immunantworten induzieren zu können. Um dies zu überprüfen, wurde die Nanopartikelaufnahme über verschiedene Applikationswege getestet. Zunächst wurden CaP Nanopartikel mit fluoreszierendem CpG^{Alexa488} funktionalisiert. CaP/CpG^{Alexa488} Nanopartikel wurden intraperitoneal (IP) in naive BALB/c Mäuse injiziert und 4 Stunden später untersucht, ob CaP Nanopartikel von CD11c⁺ DCs in der Milz aufgenommen werden (Abb. 3.10). Etwa 4,5 % der DCs in der Milz waren für Alexa Fluor 488 positiv und zeigten zudem eine leicht erhöhte Expression der Moleküle CD80 und

CD86. Dies zeigt, dass die Nanopartikel erfolgreich endozytotisch aufgenommen wurden.

Eine weitere Applikationsmethode ist die intranasale (IN) Applikation, die auch für den Menschen eine sehr gute Applikationsmethode ist. 4 Stunden nach der Applikation über die Nase konnte eine Nanopartikel-positive DC Population im drainierenden Lungenlymphknoten nachgewiesen werden. Das Ergebnis demonstriert, dass funktionalisierte CaP Nanopartikel von DCs *in vivo* aufgenommen werden und deren Inhalt zu den nächstgelegenen lymphatischen Organen transportiert wird.

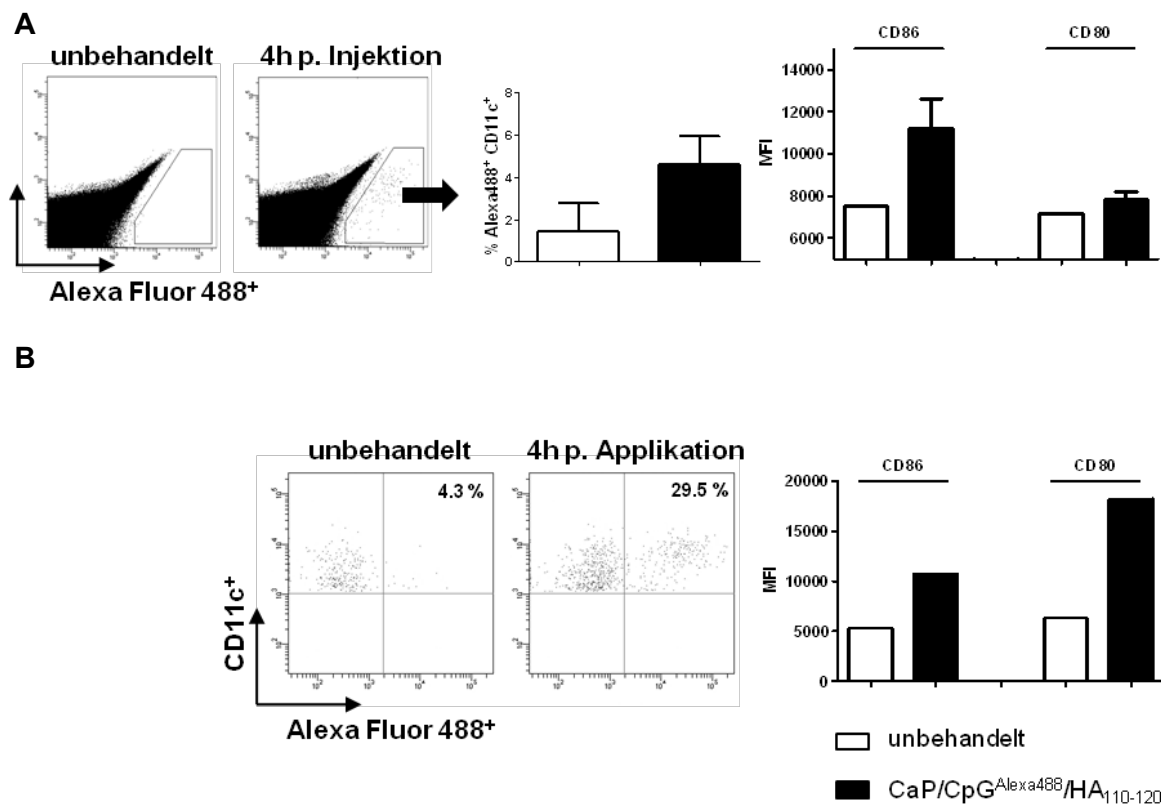


Abbildung 3.10: *In vivo* Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch APC über verschiedene Applikationswege. CaP Nanopartikel wurden mit fluoreszierendem CpG^{Alexa488} und HA₁₁₀₋₁₂₀ – Peptid funktionalisiert. A) Nach IP Injektion wurden Milzzellen 4 h später isoliert und gegen das Oberflächenmolekül CD11c gefärbt. Anschließend wurde die Analyse auf die Alexa Fluor 488 positive Zellpopulation eingegrenzt und aus dieser der Anteil der CD11c⁺ Alexa Fluor 488⁺ DCs bestimmt. Gleichzeitig wurde die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 gemessen (n=2). B) CaP/CpG^{Alexa488}/HA₁₁₀₋₁₂₀ Nanopartikel wurden intranasal verabreicht (n=2). Nach 4 h wurden Lungenlymphknotenzellen isoliert und der Anteil an Alexa Fluor 488⁺ CD11c⁺ DCs innerhalb der Alexa Fluor 488⁺ Gesamtzellpopulation bestimmt. Die Expression von CD86 und CD80 wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.3.2 *In vivo* Induktion Ag-spezifischer T-Zellantworten

Die bisherigen Ergebnisse haben nachgewiesen, dass funktionalisierte CaP Nanopartikel effektiv von APCs aufgenommen werden. Wie in Abschnitt 3.2 durch *in vitro* Experimente gezeigt, kann das verpackte Antigen durch DCs präsentiert werden und Ag-spezifische T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen. Dieser Sachverhalt wurde deshalb *in vivo* überprüft. Dazu wurden HA-spezifische CD4⁺ (TCR-HA Maus) bzw. CD8⁺ (CL4-TCR Maus) T-Zellen isoliert und mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor®670 markiert. Anschließend wurden diese in naive BALB/c Mäuse transferiert. Mäuse mit transferierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen erhielten an Tag 1 und 2 des Transfers IP Injektionen mit CaP Nanopartikel, die mit CpG und den entsprechenden HA-Peptiden HA₁₁₀₋₁₂₀ (MHCII) oder HA₅₁₂₋₅₂₀ (MHCI) funktionalisiert waren. Als Vergleichskontrolle diente die Behandlung mit löslichem CpG und dem entsprechenden HA-Peptid oder PBS. 72 (CD4⁺ T-Zellen) bzw. 48 (CD8⁺ T-Zellen) Stunden nach Transfer wurden die Proliferationsraten der HA-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anhand der Abnahme von eFluor®670 in der Milz ermittelt (Abb. 3.11). Sowohl für CD4⁺ als auch für CD8⁺ T-Zellen konnte nach CaP Nanopartikel-Behandlung Proliferation gemessen werden. Dabei war die Proliferationsrate nach Nanopartikel Injektion leicht höher als bei Behandlung mit löslichem CpG und entsprechendem HA-Peptid. Ein ähnliches Ergebnis konnte für HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen nach IN und SC Verabreichung von CaP/CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀ Nanopartikeln im Lungen- bzw. poplitealen Lymphknoten gemessen werden.

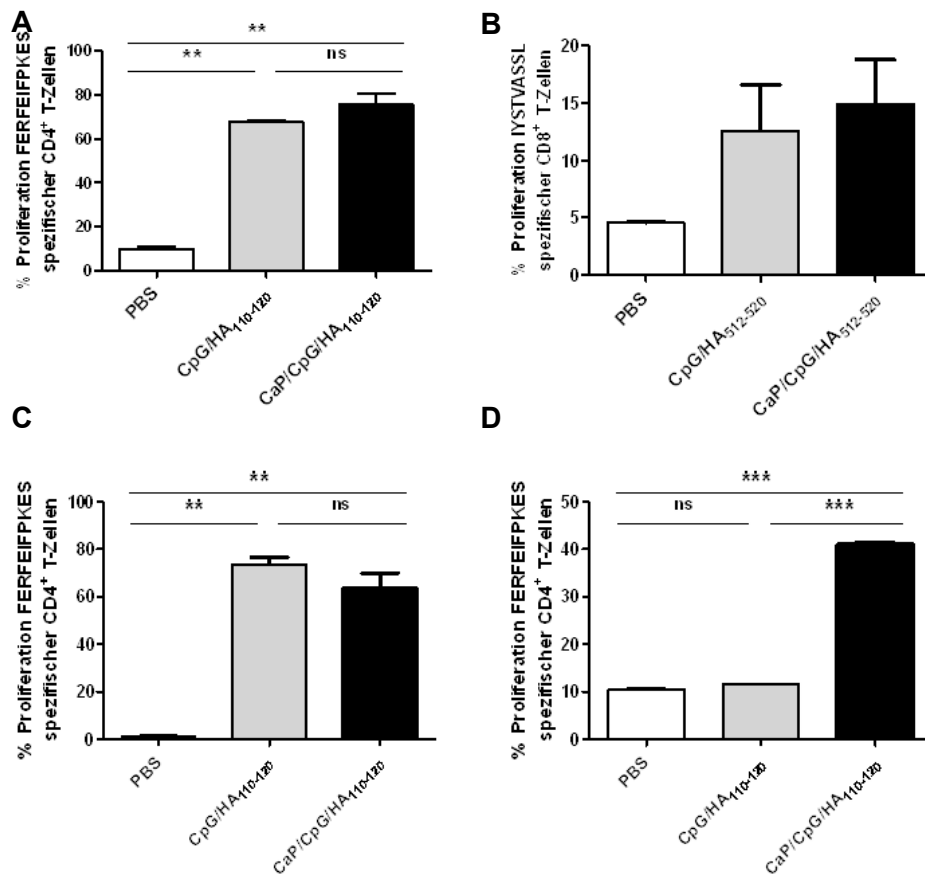


Abbildung 3.11: Induktion Ag-spezifischer T-Zellantworten *in vivo*. Ag-spezifische T-Zellen wurden aus der Milz isoliert, mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor®670 gefärbt und adoptiv über die Schwanzvene in naive BALB/c Mäuse transferiert. A) Nach dem adoptiven Transfer wurden Mäuse an Tag 1 und 2 mit löslichem CpG und HA₁₁₀₋₁₂₀-Peptid oder mit funktionalisierten CpG/ HA₁₁₀₋₁₂₀ CaP Nanopartikeln mittels IP Injektion behandelt und die Proliferation Ag-spezifischer CD4⁺ T-Zellen an Tag 4 durchflusszytometrisch gemessen. B) Mäuse wurden an Tag 1 und 2 mit löslichem CpG und HA₅₁₂₋₅₂₀-Peptid oder in funktionalisierter CaP Nanopartikel Form mittels IP Injektion behandelt und die Proliferation Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen an Tag 5 durchflusszytometrisch gemessen. Weitere Mäuse wurden an Tag 1 und 2 mit löslichem CpG und HA₁₁₀₋₁₂₀-Peptid oder in funktionalisierter CaP Nanopartikel Form mittels IN (C) oder SC (D) Applikation behandelt und die Proliferation Ag-spezifischer CD4⁺ T-Zellen an Tag 5 durchflusszytometrisch gemessen. Mindestens 2 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

3.3.3 Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion

In 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln zu einer Aktivierung von HA-spezifischen T-Zellen führt. Das Ziel einer Immunisierung ist jedoch die prophylaktische Induktion Ag-spezifischer T-Zellen und der Schutz gegen eine Infektion. Daher wurde im Folgenden getestet, ob sich funktionalisierte CaP Nanopartikel zur Induktion einer anti-viralen T-Zellantwort einsetzen lassen.

3.3.3.1 IP Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion

Zunächst wurden naive BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von jeweils zwei Wochen mit CaP Nanopartikeln immunisiert, die mit CpG und den HA-Peptiden HA₁₁₀₋₁₂₀ und HA₅₁₂₋₅₂₀ funktionalisiert waren. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde zunächst die IP Applikation gewählt. Als Vergleich wurden Mäuse mit den gleichen löslichen Faktoren oder PBS immunisiert (Abb. 3.12 A). Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen entnommen und der prozentuale Anteil HA₅₁₂₋₅₂₀ spezifischer T-Zellen bestimmt. Die Anzahl der Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen war in CaP Nanopartikel immunisierten Mäusen signifikant höher als in systemisch behandelten Mäusen (* $p < 0.05$) (Abb. 3.12 B). Nach *ex vivo* Restimulation von Milzzellen mit HA₁₁₀₋₁₂₀ oder HA₅₁₂₋₅₂₀ Peptid konnten sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ HA-spezifische T-Zellen anhand der Sekretion von IFN- γ detektiert werden. Im Vergleich zu den systemisch immunisierten Mäusen konnte auch hier eine signifikant höhere Anzahl an HA-spezifischen T-Zellen in CaP Nanopartikel behandelten Mäusen bestimmt werden (** $p < 0.001$) (Abb. 3.12 C). Diese Experimente zeigen deutlich, dass die Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln eine Virus-spezifische T-Zellantwort induziert.

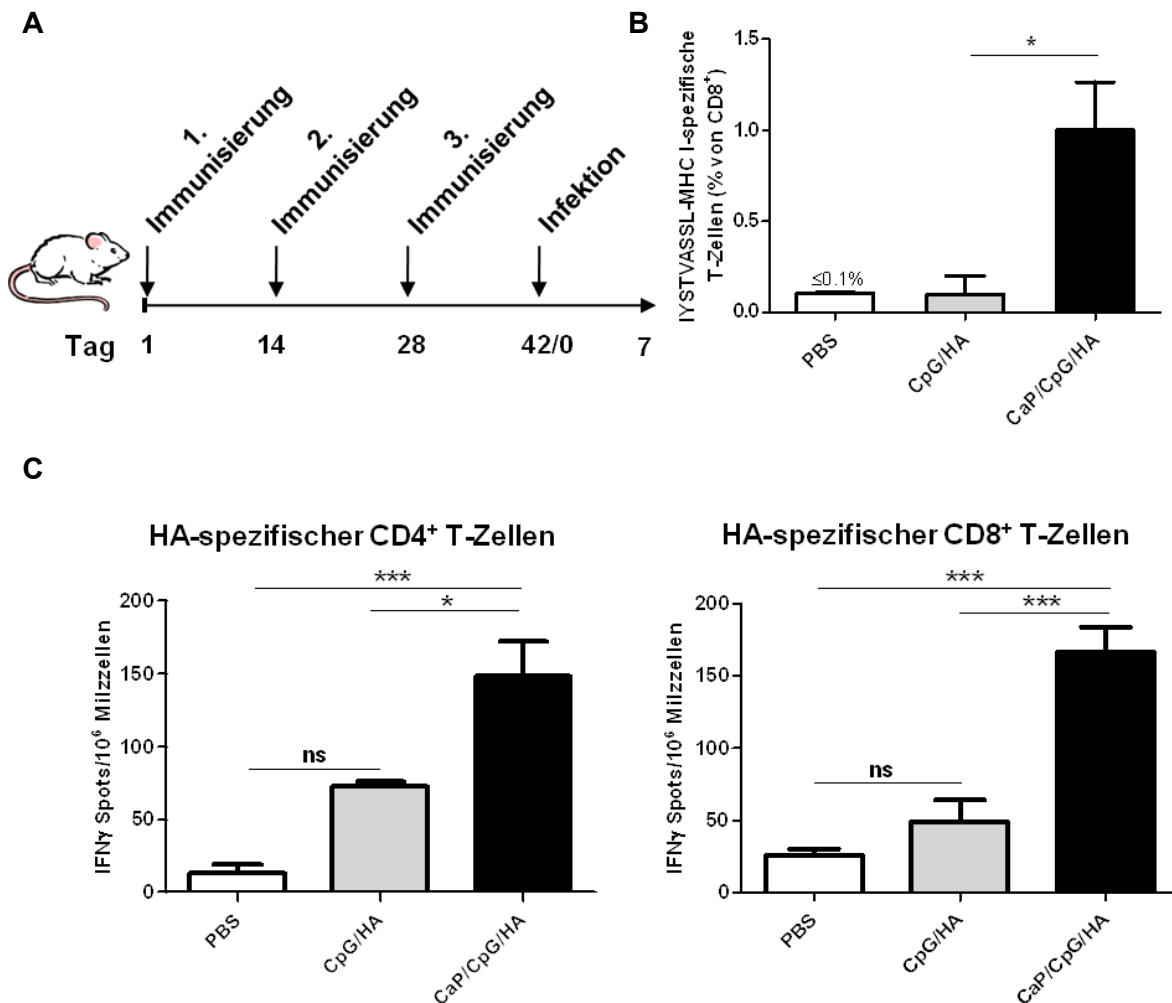


Abbildung 3.12: IP Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion. A) Naive BALB/c Mäuse wurden im Abstand von jeweils zwei Wochen dreimal mit CaP/CpG Nanopartikeln IP immunisiert, die das HA₁₁₀₋₁₂₀ und HA₅₁₂₋₅₂₀ Peptid trugen. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung (Tag 42) wurden Milzzellen isoliert und der prozentuale Anteil B) Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. C) CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen nach 24 h ex vivo Restimulation mittels IFN-γ ELISpot Assay detektiert. An Tag 42 erfolgte ebenfalls die Infektion mit einer hoch letalen Dosis (1000 PFU) des Influenza Stamms A/PR/8 H1N1 immunisierter Mäuse. 3 Mäuse wurden pro Gruppe untersucht. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$ und *** $p < 0.001$).

Als nächstes wurde überprüft, ob die erfolgreich generierte HA-spezifische T-Zellantwort im Falle einer hoch letalen Influenza Infektion effektiv anti-viral wirkt. Dazu wurden Mäuse, wie in Abbildung 3.12 beschrieben, immunisiert und zwei Wochen nach der dritten Immunisierung mit einer hoch letalen Dosis (LD100, 1000 PFU) des Influenza Stamms A/PR/8/34 H1N1 intranasal infiziert. Sieben Tage später wurde die Viruslast in den Lungen bestimmt. CaP Nanopartikel behandelte Mäuse zeigten dabei eine signifikante Reduktion der Viruslast im Vergleich zur PBS Kontrolle ($\sim 10^{3,0}$ PFU vs. $\sim 10^{3,7}$ PFU, *** $p < 0.001$) (Abb. 3.13).

In ca. 35 % der Mäuse konnte kein Virus mehr nachgewiesen werden. Dies war nicht der Fall, wenn die Mäuse systemisch mit CpG und HA-Peptiden behandelt worden waren. Zum gleichen Zeitpunkt ließen sich im Lungenlymphknoten signifikant höhere Anteile Virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur PBS und CpG/HA Gruppe nachweisen (* $p < 0.05$ und *** $p < 0.001$). Mit diesem Infektionsexperiment konnte gezeigt werden, dass die induzierte HA-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort sehr effizient die virale Replikation inhibieren kann.

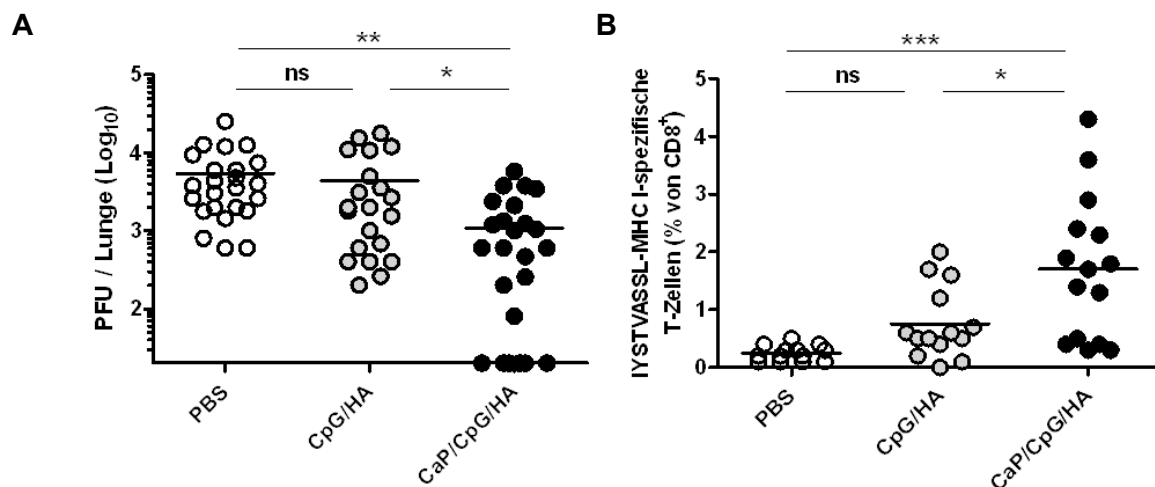


Abbildung 3.13: Virustiter und CD8⁺ T-Zellantwort nach Infektion. An Tag 42 wurden IP immunisierte Mäuse mit einer hochletalen Dosis (1000 PFU) des Influenza Stamms A/PR/8/34 intranasal infiziert. A) Sieben Tage später wurde die Viruslast in der Lunge mit einem Plaque Assay und B) der Anteil Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Lungenlymphknoten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

3.3.3.2 Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion nach IN Applikation

Mukosales Gewebe bietet für viele Pathogene eine Eintrittspforte in den Organismus (Belyakov & Ahlers 2009). Auch das Influenza Virus infiziert den Wirt über mukosale Epithelien. Damit spielt die mukosale Immunantwort bei der Influenzainfektion eine besondere Rolle und wird bei der Vakzinentwicklung berücksichtigt (Murphy *et al.* 2002, Price *et al.* 2010, Nembrini *et al.* 2011). Als nächstes wurde daher überprüft, ob die intranasale Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln eine stärkere Immunantwort generiert als nach IP Immunisierung. Dazu wurden BALB/c Mäuse analog zu 3.3.3.1 dreimal im

Abstand von jeweils zwei Wochen mit CpG und HA₁₁₀₋₁₂₀/HA₅₁₂₋₅₂₀ funktionalisierten CaP Nanopartikeln intranasal immunisiert (s. Abb. 3.12 A). An Tag 42 konnten, wie auch nach IP Immunisierung, HA-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels IFN- γ Sekretion identifiziert werden. Desweiteren ließen sich 24 h nach ex vivo Restimulation mit den entsprechenden HA-Peptiden signifikant erhöhte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2 und TNF- α , sowie dem anti-viralen IFN- γ in Zellkulturüberständen von Milzzellen der CaP Nanopartikel behandelten Mäusen nachweisen (* p <0.05, ** p <0.01 und *** p <0.001) (Abb. 3.14).

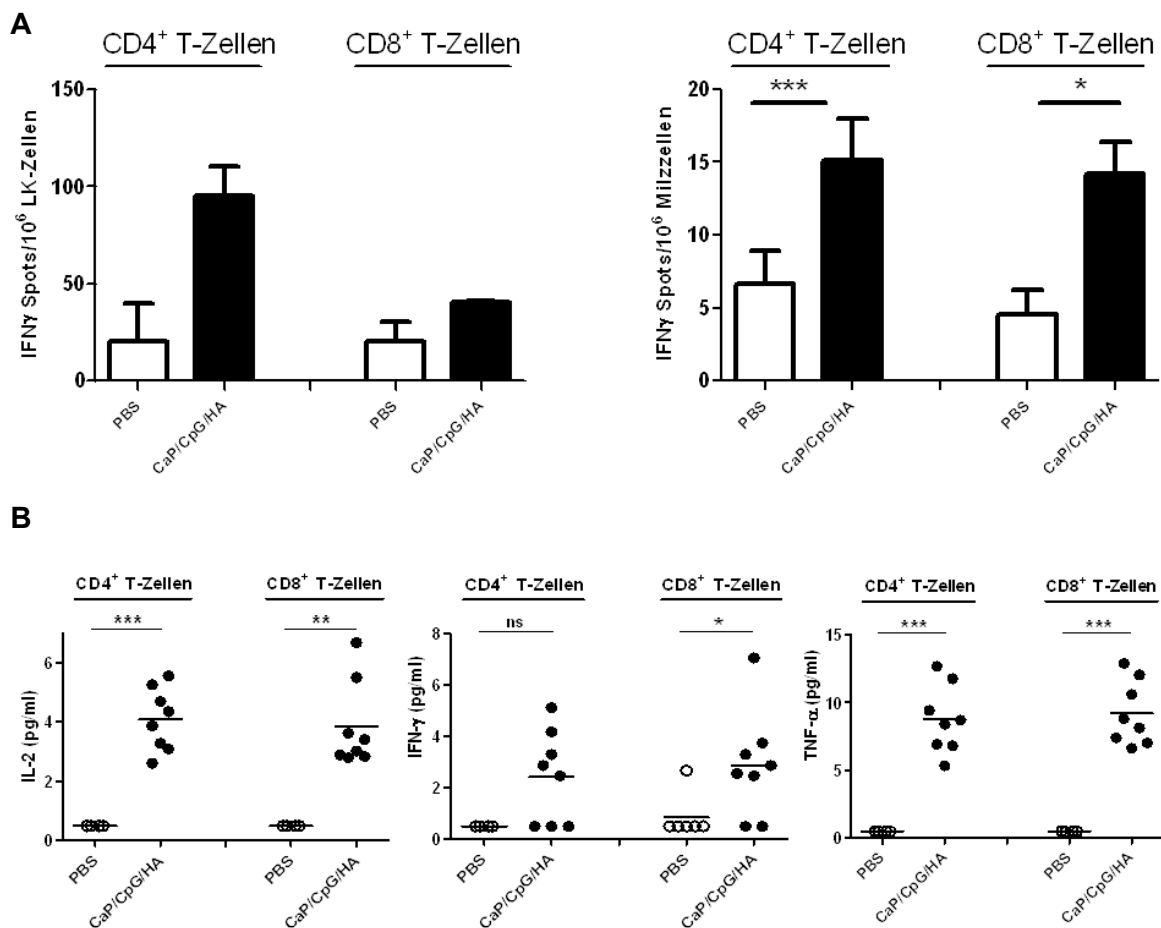


Abbildung 3.14: IN Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion. BALB/c Mäuse wurden im Abstand von jeweils zwei Wochen dreimal mit CaP/CpG Nanopartikeln IN immunisiert, die das HA₁₁₀₋₁₂₀- und HA₅₁₂₋₅₂₀-Peptid trugen. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung (Tag 42) wurden Milzzellen isoliert und die Anzahl A) Ag-spezifischer CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen nach 24 h ex vivo ReStimulation mittels IFN- γ ELISpot Assay detektiert. B) Im Zellkulturüberstand restimulierter Milzzellen konnten desweiteren IL-2, IFN- γ und TNF- α mithilfe der Luminex Technologie 24 h später nachgewiesen werden. 8 Mäuse wurden pro Gruppe untersucht. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* p <0.05, ** p <0.01 und *** p <0.001).

Um die Effizienz der intranasal induzierten Virus-spezifischen T-Zellen gegen eine Infektion mit Influenza A/PR/8/34 zu testen, wurden Mäuse zwei Wochen nach der letzten intranasalen Immunisierung mit einer hoch letalen Dosis des Influenza Virus infiziert. Als zusätzliche Kontrollgruppe wurden Mäuse infiziert, die lediglich mit löslichem CpG und den HA-Peptiden über den beschriebenen Zeitraum immunisiert wurden. Sieben Tage später wurde die Viruslast in den Lungen der infizierten Tiere bestimmt. Interessanterweise konnte auch hier die Induktion einer HA-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort durch die Behandlung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln den Virustiter signifikant reduzieren ($\sim 10^4$ PFU vs. $\sim 10^3$ PFU, $**p < 0.01$). In etwa einem Drittel (ca. 30 %) der Mäuse war das Virus nicht mehr nachweisbar. Dies war nicht der Fall, wenn Mäuse mit den gleichen Faktoren in löslicher Form immunisiert wurden (Abb. 3.15). Gleichzeitig konnte besonders in den Lungenlymphknoten der CaP Nanopartikel behandelten Mäuse eine signifikante Zunahme HA₅₁₂₋₅₂₀ spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur PBS und systemischen Gruppe bestimmt werden ($*p < 0.05$ und $***p < 0.001$). Auch in der Milz war ein signifikanter Unterschied in der Anzahl HA₅₁₂₋₅₂₀ spezifischer CD8⁺ T-Zellen detektierbar. Hier lag der prozentuale Anteil HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mit durchschnittlich 1,64 % nach CaP Nanopartikel Immunisierung sogar höher, als bei Tieren die nur systemisch behandelt wurden (0,31 %) ($***p < 0.001$). Die Daten zeigen deutlich, dass auch nach IN Immunisierung eine effiziente Inhibierung der Influenza Replikation erreicht werden kann.

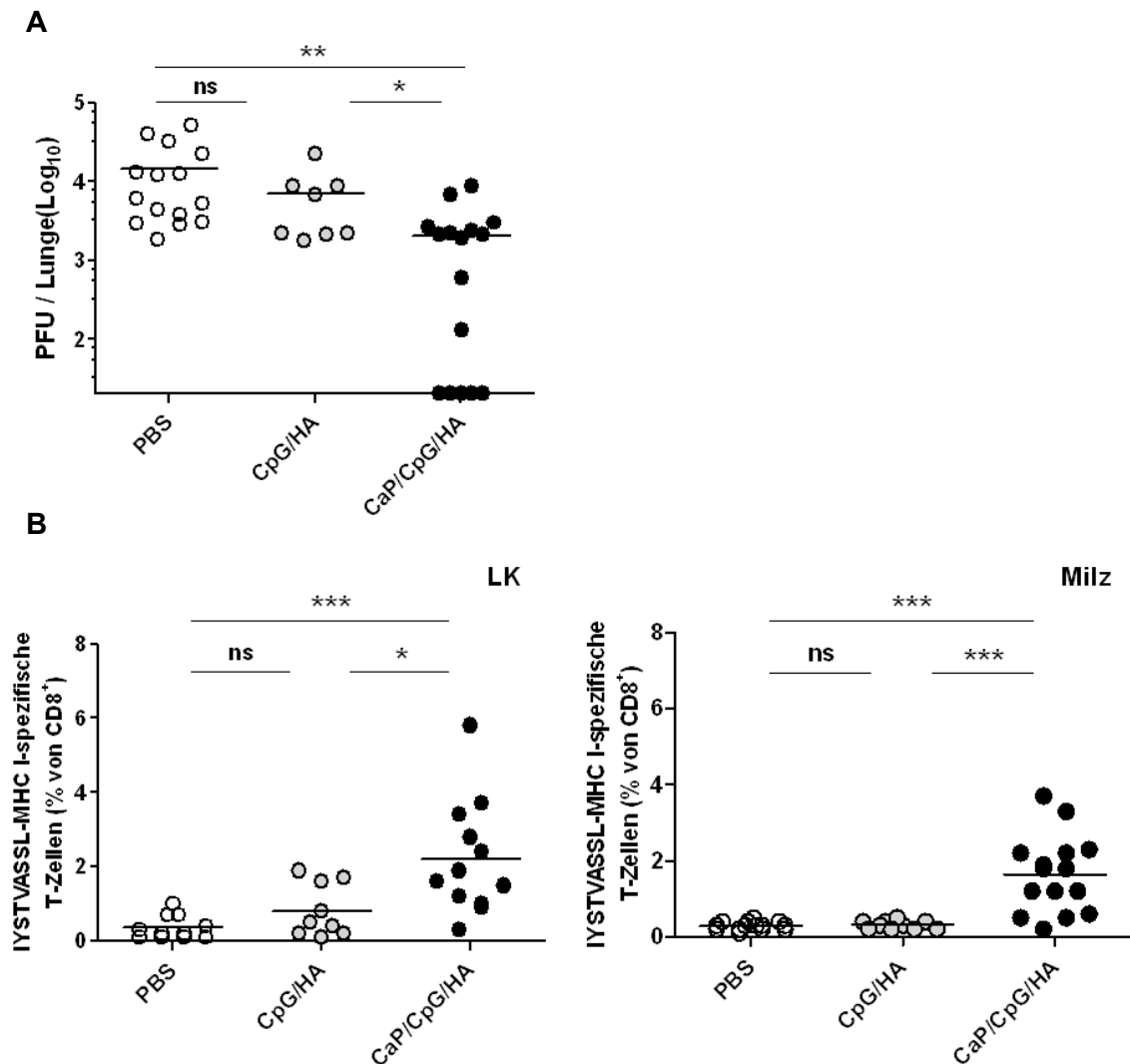


Abbildung 3.15: Influenzainfektion nach IN Immunisierung. BALB/c Mäuse wurden nach Abb. 3.12 A mit CpG/HA₁₁₀₋₁₂₀ und HA₅₁₂₋₅₂₀ funktionalisierten CaP Nanopartikeln, löslichem CpG und HA-Peptiden oder PBS intranasal immunisiert. An Tag 42 wurden immunisierte Mäuse mit einer hochletalen Dosis (LD100, 1000 PFU) des Influenza Stamms A/PR/8/34 intranasal infiziert. A) Sieben Tage später, wurde die Viruslast in der Lunge mit einem Plaque Assay und B) der prozentuale Anteil Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Lungenlymphknoten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

3.3.4 Immunisierung gegen eine Retrovirusinfektion

Die Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln konnte eindrucksvoll die Induktion und Wirkung einer Influenza spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort nach Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln zeigen. Ein potientes neues „Impfwerkzeug“ sollte allerdings flexibel einsetzbar und auch für andere Virusmodelle nutzbar sein. Deshalb wurden CaP Nanopartikel in einem retroviralen Virus Modell getestet. Das FV gehört zur Familie der Retroviren

und unterscheidet sich stark vom zuvor verwendeten Influenza Model. Frühere Arbeiten konnten durch subcutane (SC) Injektion adenoviraler Vektoren ein protektiver Schutz gegen Infektion erreicht werden (Bayer *et al.* 2009 & 2011). Die Vektoren kodierten für die viralen Proteine gp70 und GagL des FV. Orientierend an dieser Methode wurden susceptible CB6F1 Mäuse mit CaP Nanopartikeln mittels SC Injektion immunisiert, die mit CpG und dem gp70₁₂₃₋₁₄₁ sowie GagL₈₅₋₉₃ (im Folgenden nur noch als gp70- und GagL-Peptide bezeichnet) funktionalisiert waren. Zu diesem Zweck wurde mit CaP/CpG^{Alexa488} Nanopartikeln nach SC Injektion in die Hinterpfoten überprüft, ob CaP Nanopartikel von DCs aufgenommen werden und anschließend in den nächstgelegenen poplitealen Lymphknoten einwandern, um dort eine T-Zellantwort zu induzieren. 7 h nach Injektion wurden Alexa Fluor 488 positive DCs im poplitealen Lymphknoten detektiert. Abbildung 3.16 zeigt, dass 24,2 % der DCs im Lymphknoten Nanopartikel assoziiert waren.

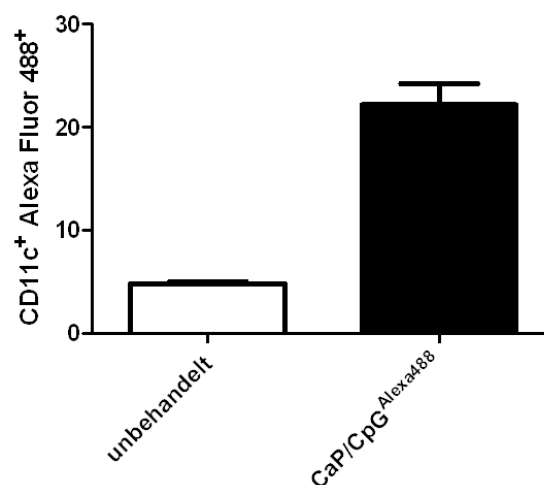


Abbildung 3.16: Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel durch DCs nach SC Injektion. CaP Nanopartikel wurden mit CpG^{Alexa488} funktionalisiert und SC in die Hinterpfoten von BALB/c Mäusen injiziert. 7h später wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen und mit einem α CD11c Antikörper gefärbt. Alexa Fluor 488⁺ DCs wurden durchflusszytometrisch detektiert. Gezeigt ist das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM.

Durch den Nachweis Nanopartikel-positiver DCs im poplitealen Lymphknoten war die Voraussetzung für eine Immunisierung über diesen Applikationsweg erfüllt. Als nächstes wurden susceptible CB6F1 Mäuse zweimal mit einem Abstand von drei Wochen mit CaP Nanopartikeln SC immunisiert, die mit CpG sowie den gp70- und

GagL-Peptiden funktionalisiert wurden (CaP/CpG/gp70/GagL). Zum Vergleich wurden weitere Mausgruppen systemisch mit CpG plus gp70- und GagL-Peptiden (CpG/gp70/GagL), nur Peptiden (gp70/GagL) oder PBS immunisiert (Abb. 3.17). Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurde der prozentuale Anteil Virus-spezifischer T-Zellen bestimmt. Abbildung 3.17 C zeigt, dass in den CaP Nanopartikel behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (CpG/gp70/GagL, gp70/GagL, PBS) signifikant höhere Zahlen gp70-spezifischer CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnten (** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$). Auch GagL-spezifische CD8⁺ T-Zellen waren im Vergleich zur PBS Kontrolle signifikant erhöht (* $p < 0.05$). Nachfolgend sollte die antivirale Effektivität der induzierten gp70- und GagL-spezifischen T-Zellimmunantwort getestet werden. Dazu wurden immunisierte Mäuse an Tag 42 mit einer Dosis von 500 SFFU („spleen focus forming units“) intravenös (IV) infiziert und eine akute FV-Infektion induziert. 10 Tage nach der Infektion wurde die Plasmavirämie bestimmt. Abbildung 3.18 A zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur PBS sowie Peptid behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion des Virus in der CaP Nanopartikel Gruppe festzustellen war (** $p < 0.01$). Da eine FV-Infektion bei suszeptiblen Mäusen eine starke Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) verursacht, ist die Milzgröße ein Indikator für die Schwere der Infektion (Hasenkrug *et al.* 1998). An Tag 10, 14, 17 sowie 21 nach der Infektion wurde die Milzgröße durch Palpieren narkotisierter Mäuse kategorisch bestimmt. Es zeigte sich im Verlaufe der dreiwöchigen Infektion deutlich, dass die Milzen mit der Zeit an Größe zunahmen. In den PBS immunisierten Tieren nahm die Größe der Milzen bis Tag 17 auf bis das 4 fache zu. Bei den systemisch behandelten Mausgruppen (gp70/GagL, CpG/gp70/GagL) konnte eine durchschnittliche Verdoppelung der Milzgröße festgestellt werden. Nur die Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln konnte die Ausbildung einer Splenomegalie verhindern. Es konnte über den dreiwöchigen Infektionsverlauf nur in der frühen Phase der Infektion (Tag 10) eine leichte Milzvergrößerung festgestellt werden. Ab Tag 17 war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten (Abb. 3.18).

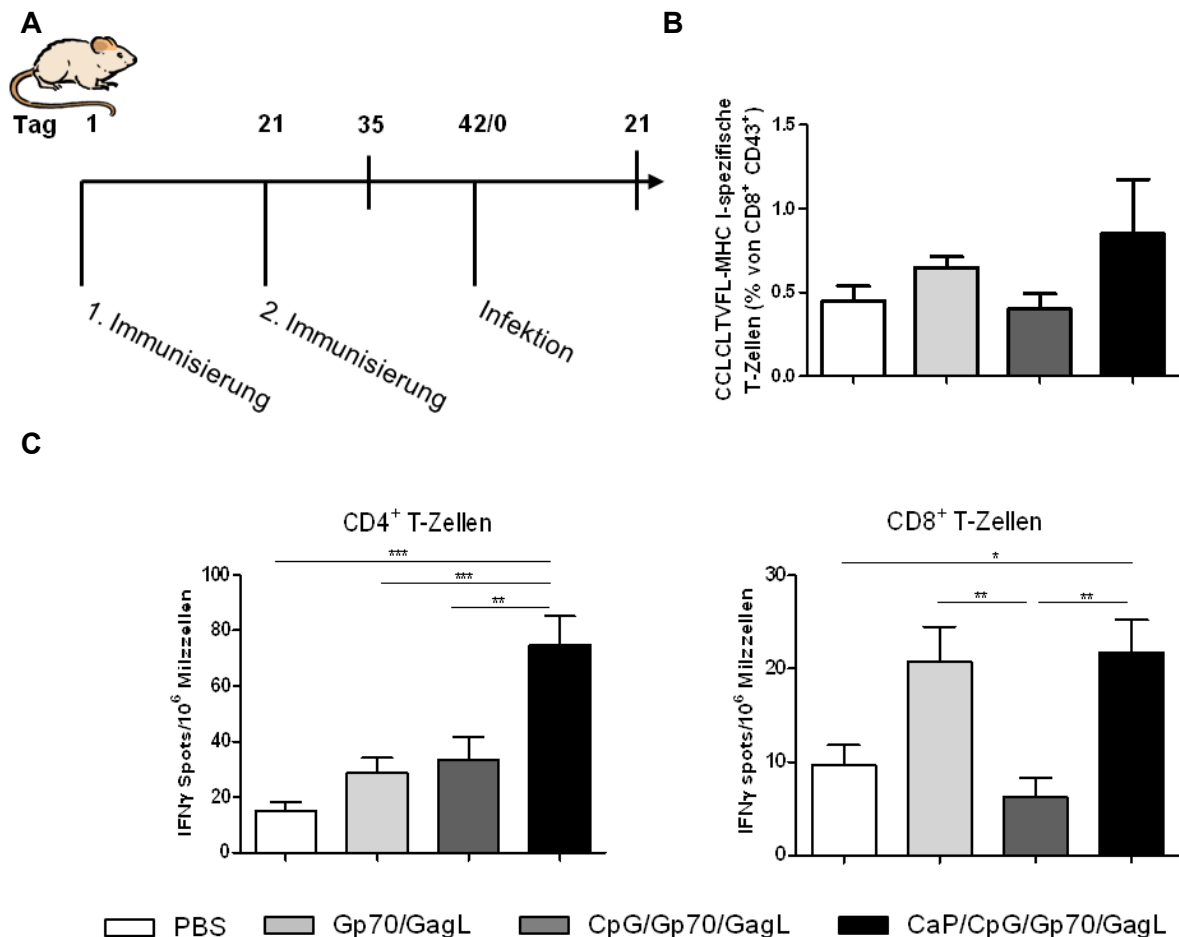


Abbildung 3.17: SC Immunisierung gegen die retrovirale Friend Virus Infektion. A) Naive CB6F1 Mäuse wurden im Abstand von drei Wochen zweimal mit CaP/CpG Nanopartikeln SC über die Hinterpfoten immunisiert, die zusätzlich das gp70₁₂₃₋₁₄₁ und GagL₈₅₋₉₃ Peptid trugen. Als Vergleichskontrolle dienten Mäuse, die mit löslichem CpG/gp70/GagL, gp70/GagL oder PBS immunisiert wurden. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung (Tag 35) wurden Milzzellen isoliert und der prozentuale Anteil B) Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch detektiert und C) CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen nach 24 h ex vivo Restimulation mittels IFN-γ-ELISpot Assay detektiert. An Tag 42 wurden immunisierte Mäuse mit 500 SFFU infiziert. 8 Mäuse wurden pro Gruppe untersucht. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung aus zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

Abschließend wurden an Tag 21 die Milzen entnommen und gewogen. Hier bestätigten sich die Ergebnisse aus den Kategorisierungen der Milzen. Das durchschnittliche Milzgewicht lag in der CaP Nanopartikel Gruppe (131 mg) deutlich unter der CpG/gp70/GagL- (881 mg) sowie gp70/GagL- (1379 mg) und PBS-(1467 mg) Gruppe. Auch die Viruslast war in den CaP Nanopartikel immunisierten Mäusen stark reduziert (Abb. 3.18 D). Das Ergebnis des IC („infectious center“-Assay zeigte eine um 6 log-Stufen verringerte Anzahl infizierter Zellen in der Milz durch zweimalige Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln verglichen mit der unbehandelten PBS Gruppe (10^2 IC vs. 10^7

IC). Weiterhin war eine niedrigere Viruslast in den CaP Nanopartikel behandelten Mäusen als in den systemisch behandelten Gruppen (10^4 IC nach Peptid Immunisierung vs. 10^3 IC nach CpG/Peptide Immunisierung) zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit CpG sowie gp70 und GagL funktionalisierten CaP Nanopartikeln das Krankheitsbild nach FV-Infektion deutlich verbessert und einen signifikanten Vorteil in der Effektivität gegenüber der systemischen Behandlung mit gp70- und GagL-Peptiden oder CpG und Peptiden bietet.

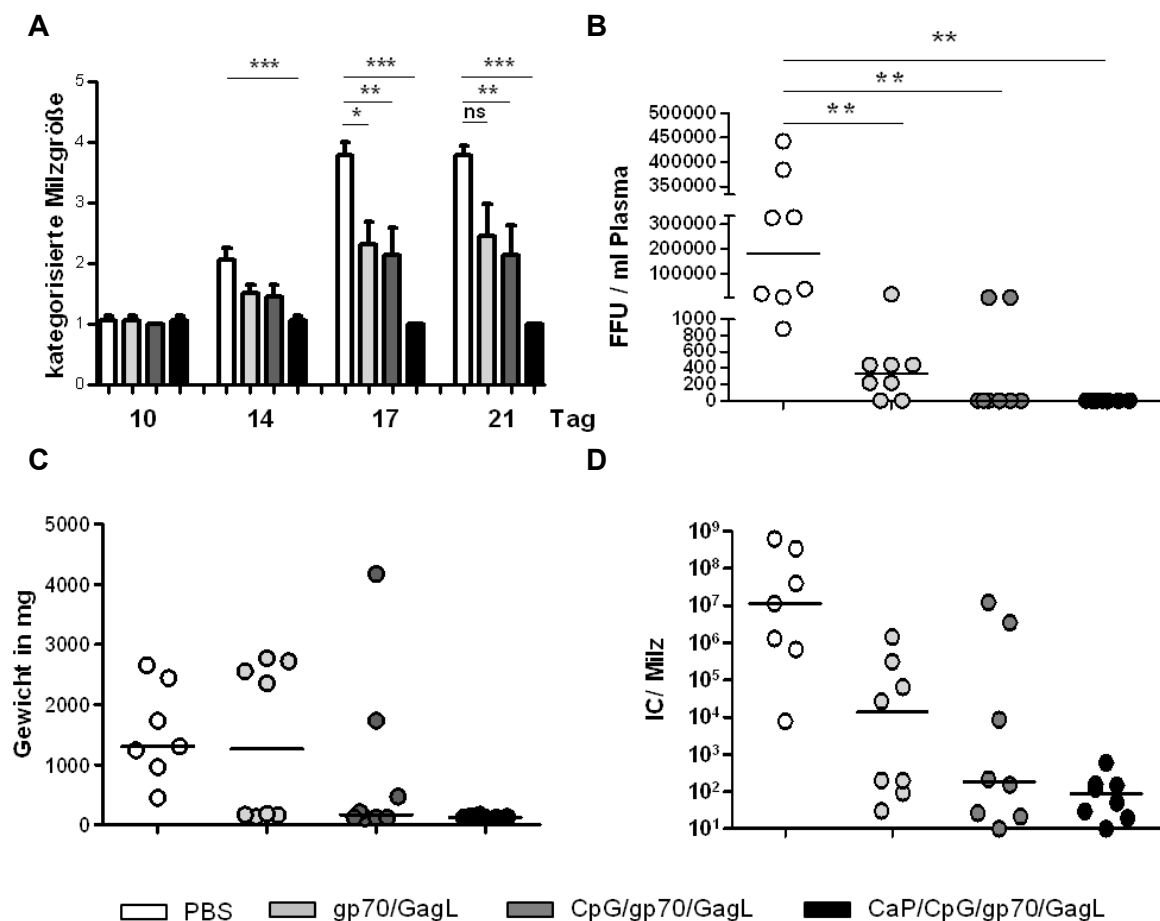


Abbildung 3.18: Friend Virus Infektion nach Immunisierung. Immunisierte CB6F1 Mäuse wurden an Tag 42 mit 500 SFFU intravenös infiziert. A) Über die Infektionsdauer von 3 Wochen wurde die Milzgröße durch Palpieren kategorisch eingeteilt. Mittelwert und Standardabweichung sind gezeigt. B) An Tag 10 nach Infektion wurde die Plasmavirämie über das Auszählen infizierter Zellfoci bestimmt (focus forming units, FFU) bestimmt. C) An Tag 21 wurden Milzen entnommen und das finale Gewicht bestimmt, sowie D) die Anzahl der infektiösen Zellen bestimmt. 8 Mäuse wurden pro Gruppe untersucht. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung aus zwei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

Um die Effektivität der Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln gegenüber der systemischen Immunisierung zu testen, wurden immunisierte Mäuse an Tag 42 mit einer 5 fach höheren Virus Dosis (2500 SFFU) als zuvor infiziert (500 SFFU). Abbildung 3.19 zeigt, dass schon an Tag 10 der Infektion mit hoher Dosis eine durchschnittlich 4 fache Vergrößerung der Milz in PBS behandelten Mäusen zu messen war. Zu diesem Zeitpunkt war dagegen nur eine Verdoppelung der Milzgröße (** $p < 0.01$) bei CaP Nanopartikel behandelten Mäusen zu beobachten, wobei 60 % der Mäuse eine unveränderte Milzgröße aufwiesen. Auch in der nur mit Peptiden (3,5 fach) und systemisch behandelten CpG plus Peptide (3 fach) Gruppe waren signifikante Milzvergrößerungen festzustellen. Gleichzeitig war die Anzahl der infizierten Zellen im Blut nach CaP Nanopartikel Immunisierung am deutlichsten reduziert (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Der Verlauf der Splenomegalie wurde bis Tag 21 nach Infektion verfolgt, wobei an Tag 21 im Vergleich zu allen übrigen Kontrollgruppen, signifikant kleinere Milzen in CaP Nanopartikel behandelten Mäusen festgestellt wurden (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Abb. 3.19 C). Zum gleichen Zeitpunkt wurde mittels IC-Assay die geringste Viruslast in der Milz bei CaP Nanopartikel behandelten Mäusen festgestellt (10^3 (CaP) vs. 2×10^5 (CpG/Peptide), $4 \times 10^{5.5}$ (Peptide) und 10^7 (PBS) IC) (Abb. 3.19 D). Damit war der Unterschied zwischen den systemisch behandelten Gruppen und der Nanopartikel Gruppe noch deutlicher als zuvor bei Infektion mit nur 500 SFFU (s. Abb. 3.18 D). Das Ergebnis der beiden Infektionsexperimente zeigt deutlich, dass es die Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln einen signifikant stärkeren Schutz gegen Virus-Infektionen induziert als die systemische Immunisierung mit den gleichen Komponenten.

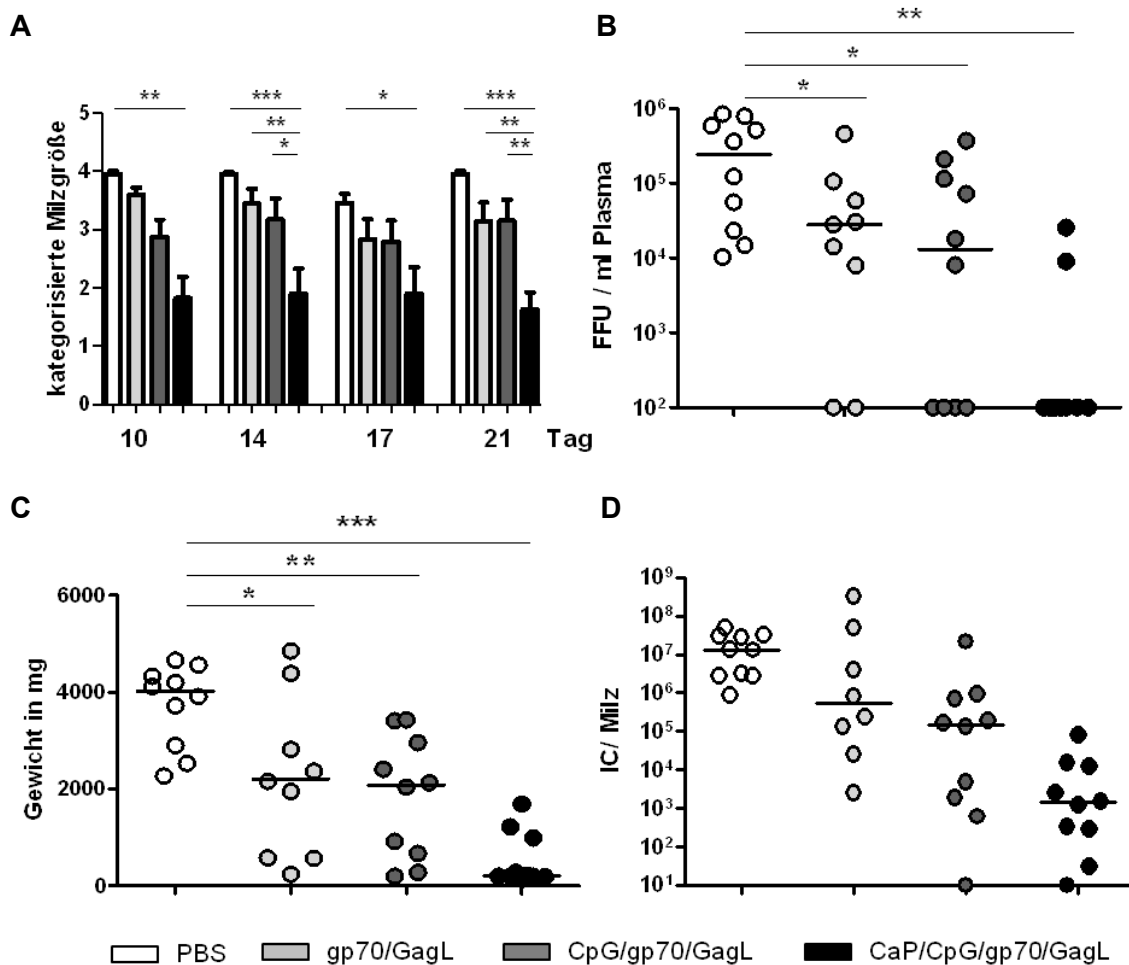


Abbildung 3.19: Friend Virus Infektion nach Immunisierung. Immunisierte CB6F1 Mäuse wurden an Tag 42 mit 2500 SFFU intravenös infiziert. A) Über die Infektionsdauer von 3 Wochen wurde die Milzgröße durch Palpieren kategorisch eingeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. B) An Tag 10 nach Infektion wurde die Plasmavirämie bestimmt. Die Querbalken zeigen den Median. C) An Tag 21 wurden Milzen entnommen und das finale Gewicht bestimmt, sowie D) die Anzahl der infektiösen Zellen bestimmt. Die Querbalken stellen den jeweiligen Median dar. 10 Mäuse wurden pro Gruppe untersucht. Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der Median. Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

3.3.5 Therapeutische Immunisierung gegen eine chronische Retrovirus Infektion

Unter Punkt 3.3.4 wurde der prophylaktische Nutzen einer Immunisierung mit spezifisch funktionalisierten CaP Nanopartikeln gegen eine akute Retrovirusinfektion untersucht. Da Retroviren in das Wirtsgenom integrieren, kommt es häufig zu chronischen Infektionsverläufen, bei denen es dem Immunsystem nicht gelingt das Virus vollständig zu beseitigen. Das bekannteste Problem stellt eine Infektion mit dem retroviralen HI Virus dar. Aufgrund des genetischen Hintergrundes ist der für eine FV-Infektion resistente C57BL/6

Mausstamm hervorragend für Studien einer chronischen FV-Infektion geeignet (Hasenkrug & Chesebro 1997, Dittmer *et al.* 2004, Dietze *et al.* 2011) und wurde im Folgenden genutzt werden, um das CaP Nanopartikelsystem für eine therapeutische Anwendung in diesem Infektionsmodell zu testen. Dazu wurden C57BL/6 Mäuse mit einer hohen Virusdosis (45000 SFFU) infiziert. Nach 6 Wochen hat sich in resistenten Mäusen eine chronische Infektion etabliert. Chronisch infizierte Mäuse wurden einmalig mit CpG/gp70/GagL-funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch SC Immunisierung behandelt (Abb. 3.20). 7 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen sowie Lymphknoten entnommen. Bei der Analyse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beider Organe zeigte sich, dass nach Behandlung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln signifikant höhere Anzahlen IFN- γ -sezernierender Zellen detektierbar waren als in der PBS- oder CpG/Peptide-Gruppe (Abb. 3.20 B). Dabei lag die Anzahl nach CaP Nanopartikel Behandlung nochmal höher als in der mit löslichen Faktoren behandelten Gruppe. Durch weitere durchflusszytometrische Analysen konnte zudem in CaP Nanopartikel behandelten Mäusen der höchste Anteil GagL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen sowohl in der Milz (Abb. 3.20 C) als auch den Lymphknoten (Abb. 3.20 D) sowie eine erhöhte Expression des zytotoxischen Proteins Granzym B in CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Da bereits in Studien gezeigt werden konnte, dass regulatorische T-Zellen Einfluss auf den Infektionsverlauf einer chronischen FV-Infektion besitzen (Dietze *et al.* 2011), wurde der Effekt der Behandlung auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen in Milz und Lymphknoten untersucht. Hier induzierte sowohl die einmalige Behandlung mit CaP Nanopartikeln als auch mit löslichem CpG und Peptiden eine Reduktion Foxp3⁺ CD4⁺-Zellen in der Milz. Dabei war die Reduktion nach Behandlung mit löslichen Faktoren leicht geringer als bei der CaP Nanopartikel Gruppe. In den Lymphknoten war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt. Die Ergebnisse zeigen, dass schon eine einmalige Behandlung mit funktionalisierten CaP-Nanopartikeln zu einer Vermehrung Virus-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Milz und Lymphknoten führt und einen positiven Einfluss auf die anti-virale Aktivität dieser Zellen hat. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt als nach Behandlung mit löslichem CpG und gp70₁₂₃₋₁₄₁- sowie GagL₈₅₋₉₃-Peptid. Um zu untersuchen, ob diese positiven Effekte auf die Zusammensetzung des T-Zellpools gleichzeitig Auswirkungen auf die Viruslast hat, wurde an Tag 7 nach Behandlung die Viruslast in Milz und Lymphknoten

bestimmt. Dabei konnte in der Gruppe der CaP Nanopartikel behandelten Tiere im Vergleich zu der PBS immunisierten Gruppe eine signifikante Reduktion der Viruslast in der Milz (** $p < 0.01$) und auch in den Lymphknoten (* $p < 0.05$) festgestellt werden (Abb. 3.21). Nach Behandlung mit löslichem CpG und gp70₁₂₃₋₁₄₁ sowie GagL₈₅₋₉₃-Peptid konnte keine signifikante Reduktion der Viruslast in Milz und Lymphknoten bestimmt werden. Es konnte daher eindeutig gezeigt werden, dass die Behandlung chronisch infizierter Mäuse mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln zu einer effektiven Aktivierung Virus-spezifischer T-Zellen führt.

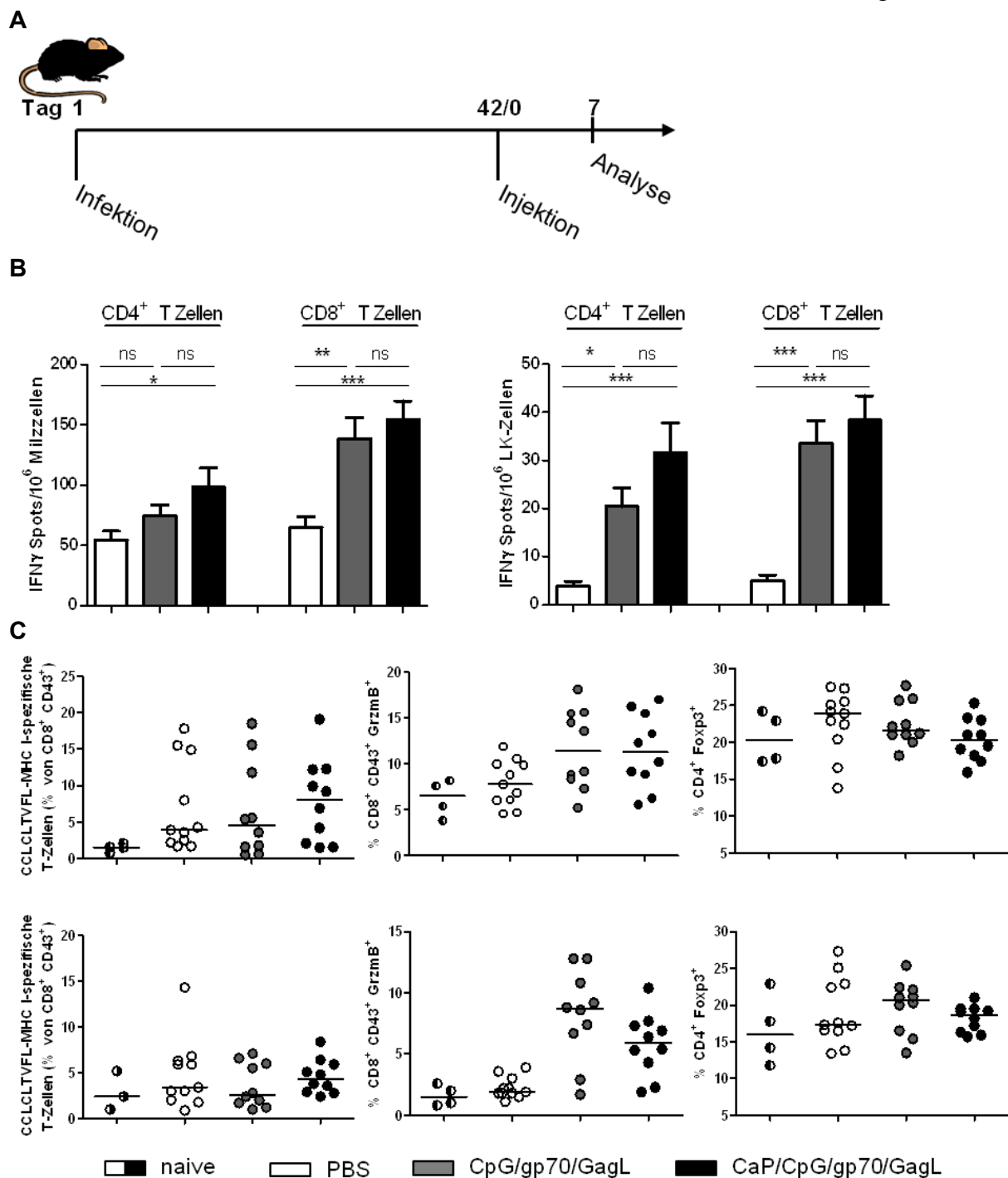


Abbildung 3.20: T-Zell Charakterisierung nach therapeutischer Behandlung einer chronischen Friend Virus Infektion. A) C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 1 mit einer hohen FV Dosis (45000 SFFU) infiziert. 6 Wochen später (Tag 42) war eine chronische Infektion etabliert und die Mäuse wurden mit CpG und gp70₁₂₃₋₁₄₁-Peptid und GagL₈₅₋₉₃-Peptid funktionalisierten CaP Nanopartikeln oder löslichem CpG und Peptiden in beide Hinterpfoten immunisiert. 7 Tage später wurden jeweils Milz und Lymphknoten entnommen und analysiert. B) CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen wurden nach 24 h *ex vivo* Restimulation von Milz- oder Lymphknotenzellen mittels IFN-γ ELISpot Assay detektiert. T-Zellen aus der Milz (C) sowie den Lymphknoten (D) wurden weiter auf GagL₈₅₋₉₃-Spezifität sowie der Expression von Granzym B (CD8⁺) und Foxp3 (CD4⁺) durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der Mittelwert, in B mit SEM. Für die statistische Analyse wurde eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

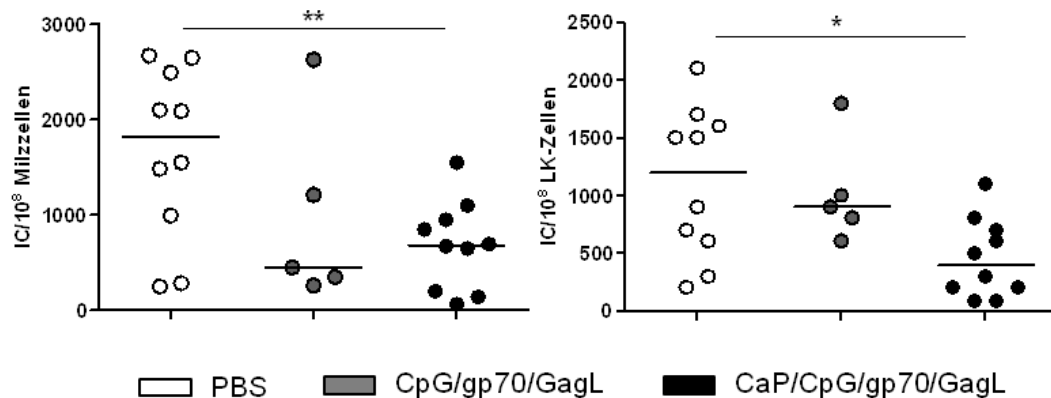


Abbildung 3.21: Effekt der therapeutischen Behandlung einer chronischen Friend Virus Infektion auf die Viruslast. An Tag 7 nach der Behandlung chronisch infizierter C57BL/6 Mäuse wurde die Viruslast in Milz und Lymphknoten bestimmt. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der Median. Die statistische Analyse zwischen den verschiedenen Gruppen, wurde durch eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ ausgeführt (* $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$).

3.4 Spezifisches Adressieren von DCs mit CaP Nanopartikeln

3.4.1 *In vitro* Aufnahme von α CD11c funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch DCs

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass funktionalisierte CaP Nanopartikel erfolgreich als Immunisierungsvehikel eingesetzt werden können. Dabei konnte gezeigt werden, dass CaP Nanopartikel *in vivo* von professionellen APCs wie DCs aufgenommen werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass CaP Nanopartikel nach Injektion auch von weiteren Zellen mit Phagozytoseeigenschaften aufgenommen werden. Um die Effektivität dieses Nanopartikelsystems möglicherweise noch zu steigern, sollte eine weitere Spezifizierung des Systems mit einer zielgerichteten Bindung durchgeführt werden. In enger Kooperation mit dem Institut für anorganische Chemie und Zentrum für Nanointegration der Universität Duisburg-Essen wurden CaP Nanopartikel modifiziert und Antikörper mit dem FC-Teil an CaP Nanopartikel kovalent gebunden. Dazu wurde eine den CaP-Kern umgebende Polyethylenimin (PEI)- sowie Siliziumoxid(SiO₂)-Schicht hinzugefügt (Kozlova *et al.* 2011). Abbildung 3.22 zeigt eine schematische Darstellung eines modifizierten CaP Nanopartikels. Um die gesteigerte Adressierung dieses Nanopartikeltyps zu testen, wurden CaP Nanopartikel mit FITC gekoppelten α CD11c-Antikörpern

funktionalisiert und mit Milzzellen einer naiven BALB/c Maus für 4 Stunden *in vitro* inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Allophycocyanin gekoppelten α CD11c-Antikörper gefärbt. Durchflusszytometrisch wurde dann der prozentuale Anteil der für beide Fluorophore (FITC und Allophycocyanin) positiven DC Population bestimmt. Um die Effektivität der Bindung eines spezifischen Antikörpers auf CaP Nanopartikel beurteilen zu können, wurden Milzzellen mit CaP Nanopartikeln inkubiert, die mit der passenden IgG-Isotyp Kontrolle funktionalisiert waren. Dabei zeigte sich, dass sich durch die Funktionalisierung der Nanopartikel mit α CD11c-Antikörpern bereits nach 4 h eine Assoziation von ca. 95 % der in der Milzzellkultur enthaltenen DCs mit CaP Nanopartikeln erreichen lässt. Nach Inkubation mit CaP Nanopartikeln, die dagegen mit der Isotyp Kontrolle funktionalisiert waren, war diese Assoziation mit 16,4 % um ein vielfaches geringer. Dieser Versuch zeigte, dass sich die Adressierung der CaP Nanopartikel durch Funktionalisierung mit zellspezifischen Antikörpern deutlich steigern lässt.

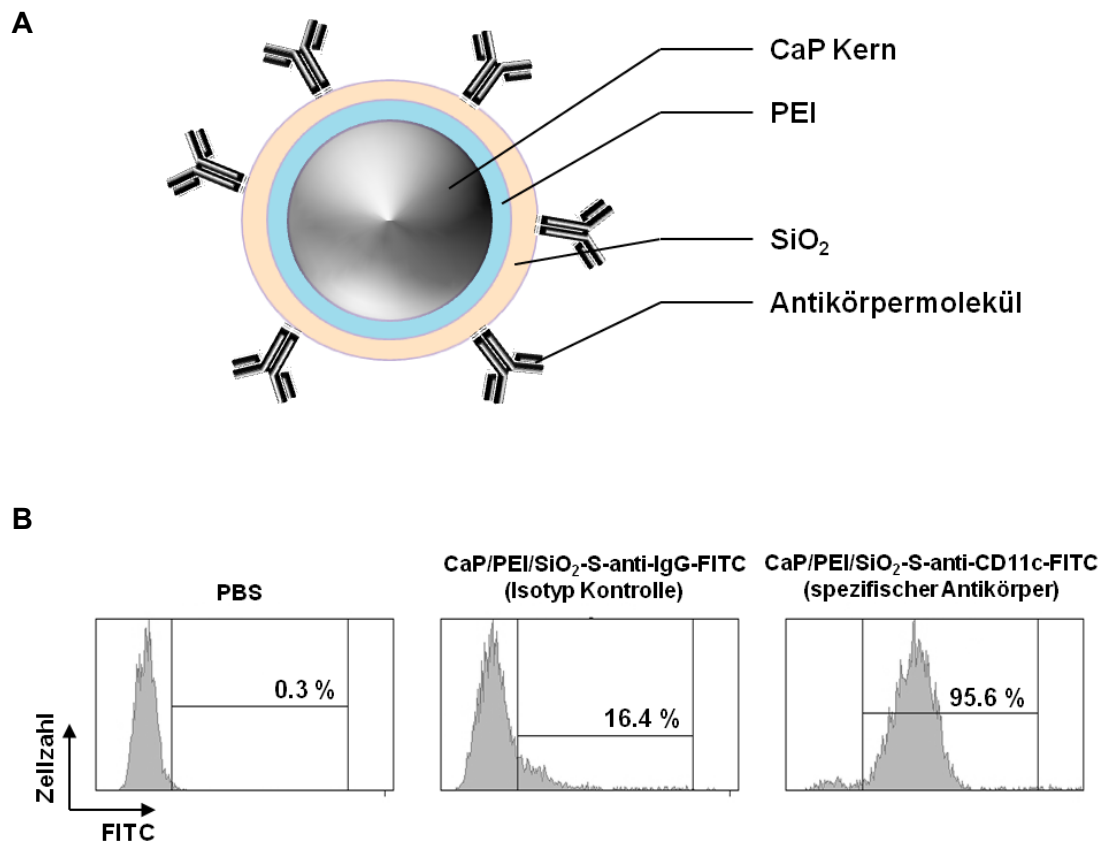


Abbildung 3.22: Funktionalisierung von CaP Nanopartikeln mit Antikörpermolekülen. A) Schematische Darstellung eines mit Antikörper funktionalisiertem CaP Nanopartikels. Für die Bindung des Antikörpermoleküls wird ein CaP Kern mit Polyethylenimin (PEI) sowie Siliziumoxid (SiO₂) beschichtet. Eine weitere CaP Hülle entfällt. B) Milzzellen wurden aus BALB/c Mäusen isoliert und für 4 h mit PBS, CaP Nanopartikeln mit gebundenem α CD11c-Antikörper oder CaP Nanopartikeln mit der passenden IgG-Isotyp Kontrolle inkubiert. Beide Antikörper waren mit einem FITC-Fluorophor assoziiert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil FITC-fluoreszierender CD11c⁺ Zellen am Gesamtanteil CD11c⁺ Zellen bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten. (Veröffentlicht in Kozlova *et al.* 2011)

3.4.2 *In vivo* Aufnahme von α CD11c Antikörper funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch DCs

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt des Zell-spezifischen Adressierens auch *in vivo* möglich ist, wurden Antikörper funktionalisierte CaP Nanopartikel *in vivo* angewendet. 4 Stunden nach Injektion wurden die Milzen entnommen und der Anteil Nanopartikel-positiver DCs analysiert. Etwa 45 % der DCs in der Milz waren mit α CD11c funktionalisierten CaP Nanopartikeln assoziiert (Abb. 3.23). Eine vergleichbar hohe Assoziation war nach Injektion mit IgG-Isotyp funktionalisierten CaP Nanopartikeln nicht zu detektieren (etwa 4 %). Somit ist die Funktionalisierung mit spezifischen Antikörpermolekülen auch *in vivo* äußerst effektiv.

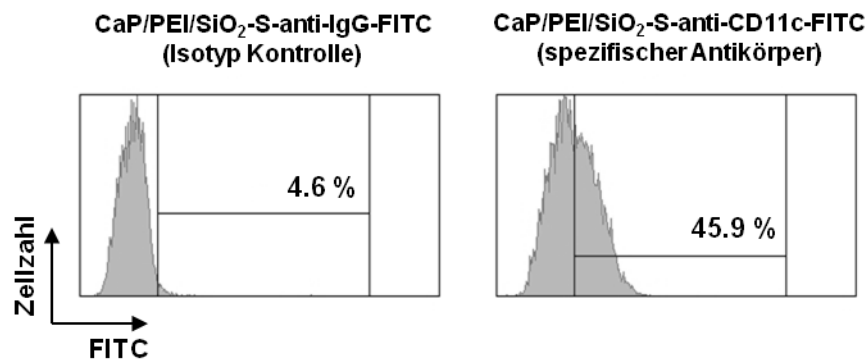


Abbildung 3.23: In vivo Anwendung Antikörper-funktionalisierter CaP Nanopartikel. CaP Nanopartikel wurden mit α CD11c oder dem entsprechenden IgG-Isotyp Kontrollantikörper funktionalisiert und über die Schwanzvene in jeweils 2 naive BALB/c Mäuse injiziert. Die Antikörper waren mit dem Fluorophor FITC konjugiert. 4 h nach der Injektion, wurde der Anteil Nanopartikel positiver DCs in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.3 Induktion einer Influenza Virus-spezifischen T-Zellantwort mit α DEC205-funktionalisierten CaP Nanopartikeln

Die vielversprechenden Ergebnisse aus der *in vitro* und *in vivo* Anwendung der Ak-funktionalisierten CaP Nanopartikel lassen auf eine spezifische Adressierung der Nanopartikel schließen. Um analog zu Abschnitt 3.3.1 die Effekt einer spezifischen Zelladressierung in Bezug auf die Induktion Ag-spezifischer T-Zellen zu testen, wurden CaP Nanopartikel mit CpG, HA-Peptiden (HA₁₁₀₋₁₂₀ und HA₅₁₂₋₅₂₀) sowie α DEC205 Antikörpern funktionalisiert (CaP/DEC205) und für die Immunisierung verwendet. DEC205 wurde in Arbeiten zuvor als Endozytoserezeptor identifiziert und wird von einer kleinen Subpopulation CD8⁺ DCs exprimiert (Tacken *et al.* 2007). CD8⁺ DCs gehören zu den konventionellen DCs und gelten als besonders effektiv in der Kreuzpräsentation exogen aufgenommener Antigene. Als Vergleich wurden Nanopartikel hergestellt, die mit dem zu DEC205 passenden Isotyp Antikörper GI117 funktionalisiert wurden (CaP/GI117). Naive BALB/c Mäuse wurden im Abstand von jeweils zwei Wochen dreimal IP immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung (Tag 42) wurde die Anzahl HA-spezifischer CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl nach CaP/DEC205 als auch CaP/GI117 Immunisierung signifikant höhere Anzahlen an HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur unbehandelten PBS Gruppe induziert werden konnten (** $p < 0.01$).

Dennoch war die Anzahl HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in CaP/DEC205 behandelten Mäusen im Vergleich zur Ig-Isotyp Kontrollgruppe CaP/GI117 um ca. 8 % höher. Bei Vergleich der HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, war der Unterschied deutlicher. Hier konnte anhand der IFN- γ Sekretion eine signifikante Erhöhung der HA-spezifischen Zellzahl sowohl im Vergleich zu PBS (** $p < 0.001$) als auch CaP/GI117 behandelten Mäusen (* $p < 0.05$) detektiert werden (Abb. 3.24).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CaP Nanopartikel hervorragend von DCs aufgenommen werden und verpackte Antigene so erfolgreich wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems erreichen. Die zusätzliche Funktionalisierung von CaP Nanopartikeln mit TLR-Liganden führt zu einer Aktivierung der DCs und ermöglicht die Induktion Ag-spezifischer T-Zellantworten. Über verschiedene Applikationswege konnte so ein effektiver T-Zellschutz gegen eine Influenza als auch eine retrovirale FV-Infektion induziert bzw. bei Behandlung chronisch infizierter Tiere reaktiviert werden. Das letzte Experiment zeigt deutlich, dass das vorgestellte Nanopartikelsystem viel Potential durch weitere Funktionalisierungsmöglichkeiten besitzt, um Immunantworten durch z.B. Zell-spezifische Adressierung nochmals zu effektiveren.

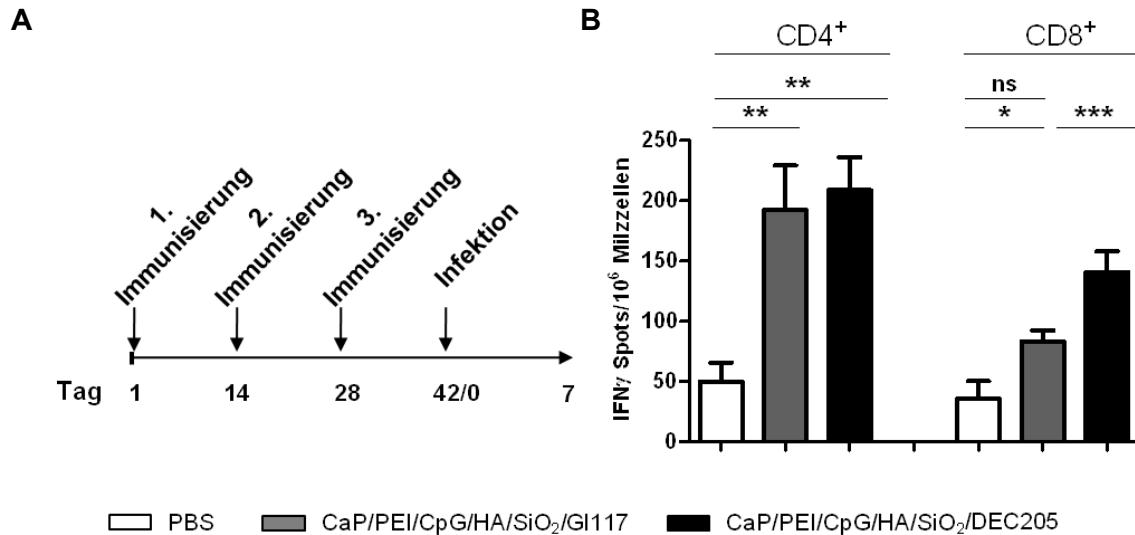


Abbildung 3.24: Induktion einer Influenza Virus-spezifischen T-Zellantwort mit α DEC205 funktionalisierten CaP Nanopartikeln. A) Naive BALB/c Mäuse wurden im Abstand von jeweils zwei Wochen dreimal mit CaP/CpG Nanopartikeln IP immunisiert, die das HA₁₁₀₋₁₂₀ und HA₅₁₂₋₅₂₀ Peptid trugen, sowie mit α DEC205- oder GI117-Antikörpern funktionalisiert waren. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung (Tag 42) wurden Milzzellen isoliert und auf die Anzahl B) HA-spezifischer CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen nach 24 h *ex vivo* Restimulation mittels IFN- γ -ELISpot Assay überprüft. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert mit mittlerer Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde über eine „one-way“ ANOVA Untersuchung mit anschließendem „Bonferroni's multiple comparisons test“ durchgeführt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

4 Diskussion

Synthetische Immunisierungsvehikel finden bereits weite Verbreitung in der Impfstoffforschung. Um die Aktivierung des Immunsystems zu verstärken, sind verschiedene partikuläre (Diwan *et al.* 2002) und auch liposomale (Chikh *et al.* 2009; Suzuki *et al.* 2004) Vehikelsysteme für den Transport pathogener Bestandteile in der Erforschung. Anders als bei Lebend- oder Totimpfstoffen versucht man bei der Verwendung synthetischer Komponenten ein Pathogen durch Verwendung von bewusst gewählten antigenen Bestandteilen, sowie Immunsystem-aktivierenden Mustern, nachzuahmen und das angeborene Immunsystem mit seinen Muster-erkennenden Rezeptoren zu aktivieren (Byrd *et al.* 2005). Gleichzeitig wird ein gewisses Sicherheitsrisiko, das bei der Verwendung von gewöhnlichen Lebend- oder Totimpfstoffen besteht, vermieden. Ein Umstand der besonders immunsupprimierte Patienten betrifft. Dabei ist die prophylaktische Induktion einer Pathogen-spezifischen Immunantwort das Ziel. Da das angeborene Immunsystem gleichzeitig die erste Barriere und Kontaktstelle des Immunsystems für ein Pathogen darstellt, ist es ein idealer Ansatzpunkt für neuartige Impfstoffe.

Synthetisch hergestellte partikuläre Strukturen gelten dabei als besonders vielversprechender Ansatz. Sie können sich in ihrer Form und Zusammensetzung sehr unterscheiden, jedoch ist immer das Ziel, bei gleichzeitiger Aktivierung einer Immunantwort, pathogenes Material den APCs effizienter zu übermitteln. Durch die partikuläre Struktur und kleine Größe werden sie sehr gut von endozytotisch aktiven Zellen aufgenommen. De Koker *et al.* stellten zum Beispiel ein Mikrokapselsystem vor (PEM, „Polyelectrolyte Microcapsules“), mit dem sich durch den Transport eines Antigens effizienter T-Zellantworten induzieren lassen, als bei systemischer Applikation des Antigens. Dies ist in der effektiveren Aufnahme des in die Mikrokapseln verpackten Antigens durch DCs begründet (De *et al.* 2010). Der DC aktivierende Effekt wurde durch die partikuläre Struktur selbst über Aktivierung des Inflammasoms vermittelt. Andere Ansätze mit Mikrosphären oder Liposomen zeigen dagegen, dass die Aktivierung von APCs gezielt durch die gleichzeitige Verpackung von PAMPs, wie TLR-Liganden, erreicht werden kann (Bal *et al.* 2011; Heit *et al.* 2007). Dass die Verwendung von partikulären Vehikeln zur Vakzinierung sehr nützlich ist, bestätigten kürzlich auch De Geest und

Kollegen. Sie konnten durch flexibles Synthetisieren ihres Systems anti-tumorale, anti-virale humorale sowie zelluläre Immunantworten in Mäusen induzieren (De Geest *et al.* 2012). Eines der am besten untersuchten Nanopartikelsysteme ist das auf Polymere-basierende Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-Nanopartikelsystem. Diese setzten sich aus den Metaboliten Laktat- und Glycolsäure zusammen und werden daher leicht vom Organismus metabolisiert. Viele Arbeiten beschreiben den erfolgreichen Transport verschiedener Moleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren sowie der Induktion protektiver Immunantworten in verschiedenen Infektions- und Tumormodellen (Danhier *et al.* 2012; Hamdy *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2005; Slutter *et al.* 2010). Allerdings zeigt dieses System einige Limitierungen in der Verpackung von Molekülen und die Kosten für die Synthetisierung der Nanopartikel sind sehr hoch. Daher werden weiterhin neue, kostengünstige und flexible Nanopartikel-Systeme zur Vakzinierung getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurden CaP Nanopartikel als neues Impfstoffvehikel charakterisiert. In umfangreichen Studien konnten CaP Nanopartikel als biomedizinische Transportvehikel für Moleküle wie Nukleinsäuren, Proteine, Peptide und andere eingesetzt werden (Epple *et al.* 2010; Sokolova *et al.* 2012). Ursprünglich wurde Calciumphosphat als Transfektionsreagenz für Zellen eingeführt (Graham and van der Eb 1973). Durch das Mischen einer Calciumchlorid-Lösung mit DNA-Molekülen, sowie einer Phosphat-Puffer Lösung bilden sich kleinste Präzipitate (Nanopartikel). Die gute Biokompatibilität (Dorozhkin and Epple 2002) dieser Präzipitate machen CaP Nanopartikel als Impfstoffvehikel sehr attraktiv. In nanopartikulärer Form wird Calciumphosphat leicht von Zellen aufgenommen und nach Abbau direkt aus der Zelle geschleust, so dass ein kritisches Level an Calcium in der Zelle nicht überschritten wird und nicht zelltoxisch wirkt (Neumann *et al.* 2009). Frei vorliegendes Calcium selbst wird im Organismus über die Nebenschilddrüse und die Niere reguliert.

Um die effiziente Aufnahme der CaP Nanopartikel zu demonstrieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahmestudie durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass funktionalisierte CaP Nanopartikel von DCs über einen Phagozytosemechanismus aufgenommen werden. Bereits nach 3 Stunden lassen sich fluoreszenzmarkierte CaP Nanopartikel in Endosom-ähnlichen Gebilden im Zytoplasma von DCs detektieren (Sokolova *et al.* 2010). Generell spielt die Größe von partikulären Strukturen für

die Aufnahmeeffizienz eine entscheidende Rolle. Partikelgrößen >200 nm führen zu einer längeren Retention des partikulären Materials in den endosomalen Kompartimenten (Foged *et al.* 2005). Zusätzlich konnten Ziorek *et al.* zeigen, dass Adjuvans-funktionalisierte Gelatin-Nanopartikel mit einer Größe von 245 nm einen immunstimulatorischen Vorteil gegenüber kleineren 135 nm im Durchmesser aufweisenden Partikeln besaßen (Ziorek *et al.* 2008). Die in dieser Arbeit etablierten funktionalisierten CaP Nanopartikel zeigen eine durchschnittliche Größe von ca. 250 nm. Diese Größe sollte daher für die Aufnahme und Aktivierung von APCs vorteilhaft sein.

Durch die Verwendung von TLR-Liganden bei der Synthese von partikulären Immunisierungsvehikeln, lässt sich die Immunantwort in eine definierte Richtung lenken. Im Rahmen der Hepatitis B Impfung befinden sich z.B. TLR4-Agonisten bereits erfolgreich im Einsatz zur Impfstoffverstärkung. Der Impfstoff Fendrix® (GlaxoSmithKline) ist aus Hepatitis B Virus (HBV) Antigenen und LPS-ähnlichen Strukturen (Monophosphoryl-Lipid A (MPL-A)) zusammengesetzt, die den TLR4 stimulieren und die Antikörperproduktion steigern. Verschiedene modifizierte Oligonukleotidsequenzen mit CpG-Mustern werden ebenfalls während der HBV Immunisierung verwendet (Heplisav®, Dynavax Technologies), da bestimmte Sequenzen vor allem die B-Zellaktivierung und damit Antikörperproduktion anregen (Hartmann *et al.* 2003; Verthelyi and Zeuner 2003). Neben der verbesserten Antikörperproduktion kann die Stimulation von TLRs aber auch die Expression von Zytokinen induzieren, die die zelluläre Immunantwort unterstützen. Die für die Erkennung von poly(I:C) und CpG zuständigen TLRs 3 und 9 sind endosomal lokalisiert und erkennen Nukleinsäuren mit bestimmten Mustern, die man bei Bakterien und Viren findet (Akira *et al.* 2006). Die Bindung des entsprechenden Liganden löst eine Signalkaskade aus, an deren Ende die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-12 und IL-6 aber auch Typ I Interferone durch die Zelle steht (Meylan *et al.* 2006; Robbins and Rossi 2005). IL-12 stimuliert die Entwicklung einer T_H1 vermittelten Immunantwort, die bei Infektionen mit intrazellulären Pathogenen wichtig ist (Mosmann and Coffman 1989). TNF- α dagegen unterstützt CD8⁺ T-Zellantworten und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung einer Infektion (Darrah *et al.* 2007). In einer Studie von Krishnamachari *et al.* wurde neben der Sekretion pro-inflammatorischer T_H1-Zytokine auch die Reifung von DCs durch CpG

beschrieben (Krishnamachari and Salem 2009). Diese pro-inflammatorischen Effekte unterstreichen das Potential von CpG als Adjuvans. Klinische Studien testen daher bereits den Einsatz von CpG (Klinman *et al.* 2009). Unter dem Namen Actilon® (Coley) werden CpG-ODNs in der Therapie von Hepatitis C Virus Infektionen eingesetzt und vermitteln eine dosisabhängige Zytokinsekretion sowie Reduktion an HCV RNA bei chronisch infizierten Patienten (McHutchison *et al.* 2007). Die Verwendung zur Therapie von Tumorerkrankungen wie Bronchialkarzinomen wird ebenfalls untersucht (ProMune®, Coley). Vielversprechende Ergebnisse wurden neben vielen anderen anti-viralen Vakzinierungsansätzen (Domingos-Pereira *et al.* 2012; Kreutz *et al.* 2012) auch innerhalb einer Influenza Vakzinierungsstudie erzielt (Gong *et al.* 2012). Insgesamt scheint der Einsatz von TLR-Liganden als Adjuvantien ein vielversprechender Ansatz zu sein. Das Potential einiger TLR-Liganden wurde in vorklinischen Studien untersucht (Bourquin *et al.* 2008; Heuking and Borchard 2012; Kanzler *et al.* 2007; Zaks *et al.* 2006).

Die Verbindung von TLR-Ligand und Antigenen in einer partikulären Struktur steigert die Aufnahme dieser Strukturen durch Phagozytose, so dass es in der Folge zu einer gesteigerten Stimulation des Immunsystems kommt. Kerkmann *et al.* konnten zum Beispiel demonstrieren, dass der immunstimulatorische Effekt von CpG durch Verpackung in eine partikuläre Struktur gesteigert werden kann (Kerkmann *et al.* 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dieser Sachverhalt mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln gezeigt werden. Nach *in vitro* Stimulation von DCs mit funktionalisierten Nanopartikeln konnte die stärkere Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und pro-inflammatorischen Zytokine detektiert werden. Dabei scheint die Aktivierung von DCs mit CpG-funktionalisierten Nanopartikeln effektiver zu sein, als mit poly(I:C)-funktionalisierten Partikeln. Dies könnte unter anderem an dem molekularen Größenunterschied zwischen CpG und poly(I:C) Molekülen liegen (Kreutz *et al.* 2012). Da CpG molekular kleiner ist als poly(I:C), können mehr CpG Moleküle an einem Nanopartikel binden und damit einen stärkeren stimulatorischen Effekt auslösen. Aufgrund der *in vitro* erzielten Ergebnisse wurden die *in vivo* Immunisierungsexperimente nur mit CpG-funktionalisierten Nanopartikeln durchgeführt.

Das Potential von funktionalisierten Nanopartikeln als Vakzinvehikel wurde im Influenza Virus Infektionsmodell untersucht. Herkömmliche Influenza Vakzine basieren meist auf abgetöteten oder nicht replikationsfähigen Viren (Treanor *et al.* 2005). Der immunologische Schutz vor Infektion wird dabei größtenteils von neutralisierenden Antikörpern gegen die viralen Oberflächenproteine HA oder NA vermittelt (Renegar *et al.* 2004). Dabei orientiert man sich an die saisonal dominierende Virusvariante, die anhand der HA- und NA-Proteine bestimmt wird. Bedingt durch den genetischen „drift“, kommt es jedoch häufig zu Veränderungen dieser Proteine, so dass die Schutzimpfung immer noch jährlich durchgeführt werden muss. Zuletzt sorgten Verunreinigungen der herkömmlich hergestellten Influenza Impfstoffe Begrippal® und Fludac® (Novartis) für Probleme. So wurde der Verkauf mehrerer Chargen dieser Impfstoffe aufgrund auftretender Nebenwirkungen gestoppt. Dieser Vorfall zeigt, dass alternative Vakzinierungsmethoden benötigt werden, da nicht nur der aufwendige und langwierige Herstellungsprozess dieser Impfstoffe mit Hilfe von Hühnereiern Risiken in der Verträglichkeit des Impfstoffes birgt (Vellozzi *et al.* 2009; Waibel and Gomez 2010), sondern es bei fehlerhaften Impfstoffchargen zusätzlich zu Engpässen in der Versorgung der Bevölkerung kommen kann und dies das Risiko einer folgenreichen Epidemie erhöht. Ähnliches gilt für alternativ hergestellte Impfstoffe wie den mittels einer Tumorzelllinie in der Zellkultur gewonnene Impfstoff Optaflu® (Novartis), bei dem der Verdacht noch nicht ausgeräumt werden konnte, möglicherweise krebserregend zu sein. Neben den wichtigen Antikörperantworten spielt die T-Zellantwort während der Influenza-Infektion eine wichtige Rolle. T-Zellantworten haben den Vorteil, dass sie kreuzreaktiv wirken können. Vor allem gegen interne Virusproteine, wie NP, aber auch das Oberflächen integrierte M2 kann Virusvarianten-übergreifender Schutz induziert werden (Tai *et al.* 2011). Da Antikörperantworten vor allem gegen die häufig variierenden Oberflächenproteine HA und NA gerichtet ist, ist hier eine Kreuzreaktivität nur bedingt möglich. Es zeigte sich allerdings auch, dass eine T-Zell geprägte Immunantwort gegen mehr als nur ein virales Protein induziert werden muss, um sicheren Schutz gegen eine Influenza Virusinfektion zu vermitteln (Song *et al.* 2011). Tai *et al.* konnten mit liposomalen Nanopartikeln demonstrieren, dass durch die Verwendung mehrerer T-Zellepitope aus verschiedenen Influenzaproteinen, wie NP, HA und M2 ein potenter Kreuzschutz

gegen mehrere Influenza A Virusvarianten induziert werden kann (Tai *et al.* 2011). Die flexible Kombination von Virus-spezifischen T-Zellepitopen und synthetisch hergestellten Immunisierungsvehikeln stellt daher eine gute Alternative zu den herkömmlichen Influenza Vakzinen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln, die MHCI und MHCII restringierte T-Zellepitope aus dem HA-Protein enthielten, intraperitoneal immunisiert. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg HA-spezifischer IFN- γ -sezernierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die erhöhte IFN- γ Sekretion ist im Verlauf der Influenzainfektion entscheidend, da die Zellinfiltration in infiziertes Lungengewebe sowie Aktivierung von NK-Zellen beeinflusst wird (Baumgarth and Kelso 1996; Weiss *et al.* 2010). Dies zeigte sich auch in den anschließenden Belastungsexperimenten mit dem Influenza Virus. Die Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln führte zu einer signifikanten Reduktion des Virustiters in der Lunge. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Anzahl Virus-spezifischer T-Zellen in den Lungenlymphknoten nach Infektion detektiert werden. Der positive Effekt auf die Viruslast muss allerdings nicht nur auf die induzierten Virus-spezifischen T-Zellen zurückzuführen sein, denn Virus-spezifische T_H1 Zellen fördern die Entwicklung weiterer Virus-spezifischer CTLs während der Infektion (Treanor *et al.* 2005).

Bei Schutz gegen eine Influenzainfektion spielt das mukosale Immunsystem der Lunge eine besondere Rolle. Gerade bei respiratorischen Viren, wie Influenza konnte gezeigt werden, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in der Lunge entscheidend am Ausgang der Infektion beteiligt sind (Kohlmeier and Woodland 2009). Das immunsupprimierende Mikromilieu in der Lunge begünstigt allerdings eher die Induktion von Toleranz und erschwert die effektive Immunantwort gegen Pathogene (Lambrecht and Hammad 2009). Durch die Funktionalisierung der CaP Nanopartikel mit CpG führte die intranasale Applikation von CaP Nanopartikeln dennoch zur erfolgreichen Induktion von IFN- γ -sezernierenden HA-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die nach Infektion die Virusreplikation und damit die Viruslast signifikant reduzieren konnten. Virus-frei waren nach beiden Applikationsmethoden (intraperitoneal, intranasal) jedoch nur ca. 30 % der CaP Nanopartikel behandelten Mäuse. Ein Vorteil des CaP Nanopartikelsystems ist allerdings die Flexibilität, die es erlaubt die Nanopartikel differenziell zu funktionalisieren. Um die anti-virale Effektivität einer CaP Nanopartikel-

Immunisierung weiter zu steigern, könnte zukünftig ein umfassendes Portfolio an T-Zellpitopen verwendet werden. Potentielle Peptide wären die von Tai und Kollegen eingesetzten Peptidsequenzen aus dem NP- und M2-Protein. Vor allem die Verwendung konservierter Epitope ist vielversprechend, um so eventuell durch frühere Infektionen präexistierende Immunitäten zu stärken (Lillie *et al.* 2012). Ein Virusstamm-übergreifender T-Zell-vermittelter Schutz ist dabei das Ziel und würde die Durchführung der jährlichen Impfung reduzieren. Die Vermeidung von Krankheitssymptomen kann allerdings vermutlich nur durch die Induktion neutralisierender Antikörper erreicht werden (Song *et al.* 2011). Daher ist es das langfristige Ziel funktionalisierte CaP Nanopartikel herzustellen, die sowohl die Induktion von Virus-spezifischen T-Zell-Antworten wie auch B-Zell-Antworten und damit die Produktion Virus-spezifischer Antikörper ermöglichen. Für den flexiblen Einsatz neuer Impfstoffansätze ist die leichte Produzier- sowie Modifizierbarkeit eine wichtige Voraussetzung. Um die Flexibilität des CaP Nanopartikelsystems zu untersuchen, wurden funktionalisierte CaP Nanopartikel als Vakzinierungsvehikel in einem zweiten, retroviralen Infektionsmodell getestet. HIV ist der bekannteste Vertreter der Retrovirus Familie und stellt ein globales Problem dar, gegen das es noch keinen sicheren Impfschutz gibt. Weltweit sind etwa 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert, von denen jährlich rund 2 Millionen Menschen an den Folgen des HIV assoziierten „Acquired Immunodeficiency Syndrome“ (AIDS) versterben. Um die Verbreitung des Virus einzuschränken, beschäftigen sich viele Forschergruppen mit der Entwicklung neuer anti-retroviraler Vakzinierungsstrategien. Die zelluläre Immunantwort spielt bei retroviraler Infektion eine entscheidende Rolle (Hom *et al.* 1991; Homsy *et al.* 1989; Takeda *et al.* 1988). Das Ziel der Vakzinierung ist daher neben der Induktion von neutralisierenden Antikörpern vor allem die Induktion effektiver CTL Antworten. Bis heute sind jedoch keine vollständig schützenden Impfstoffe etabliert. Vielversprechende Forschungsergebnisse zeigten Rerks-Ngarm und Kollegen in einer groß angelegten Impfstudie zwischen 2003 bis 2009, bei der durch einen auf viralen Pockenvektoren basierender Impfstoff etwa 26 % weniger HIV Infektionen durch erfolgreiche Antikörper und potente CTL Induktion auftraten, als in einer verglichenen Placebo-Gruppe (Rerks-Ngarm *et al.* 2009; Takeda *et al.* 1988). Auch der Einsatz adenoviraler Vektoren, die für Proteine des Virus kodieren, scheinen erfolgsversprechend (Patterson *et al.* 2009). Die Immunisierung mit diesen

Vektoren induziert eine langanhaltende humorale wie auch zelluläre Immunantwort. Allerdings zeigten negative Resultate aus einer unter dem Namen „STEP study“ veröffentlichten, adenoviralen klinischen Phase II Studie, bei der ein vorheriger natürlicher Kontakt mit dem verwendeten viralen Vektor eine erfolgreiche Immunisierung verhindern konnte, dass weitere Alternativen entwickelt werden müssen (Buchbinder *et al.* 2008).

Die erfolgreiche Entwicklung wirksamer Impfstoffe steht allerdings vor mehreren Problemen. Das bedeutendste Problem ist der Mangel eines geeigneten Tiermodells. Kleintiermodelle für HIV existieren kaum und auch die Wahl eines geeigneten Primatenmodells ist schwierig. Das für den Menschen relevante HIV-1 repliziert nur sehr schlecht in Schimpansen und zeigt eine andere Pathogenese (Novembre *et al.* 2001b), O'Neil *et al.* 2000). Einige Erkenntnisse wurden daher aus dem zu HIV verwandten Simianen Immundefizienzvirus (SIV) in Rhesusmakaken gezogen. Allerdings ist der quantitative Rahmen limitiert und das im Vergleich zur Maus geringe Wissen über die molekulare Immunologie des Affen stellt ein Problem dar. Deshalb wird häufig das murine Friend Virus für die Forschung retroviraler Fragestellungen verwendet.

Für einen vollständigen immunologischen Schutz gegen FV-Infektion sind sowohl Virus-spezifische CTLs, T_H-Zellen sowie neutralisierende Antikörper wichtig (Hasenkrug and Chesebro 1997a; Hasenkrug and Chesebro 1997b). Der Kontrollverlust nach Depletion von T-Zellen im Infektionsmodell machte jedoch deutlich, dass T-Zellen bei der Beseitigung des Pathogens essentiell sind. Ein vielversprechender Immunisierungsansatz gegen die retrovirale Infektion mittels adenoviraler Vektoren konnte kürzlich im FV-Modell etabliert werden. Dabei kodierten die viralen Vektoren für das gesamte GagL- sowie gp70 Oberflächenprotein des FV (Bayer *et al.* 2010; Bayer *et al.* 2011). Virus-spezifische CD4⁺ T-Zellen, aber auch neutralisierende Antikörper konnten die Viruslast signifikant reduzieren. Eine vollständige Klärung des Virus nach Belastungsinfektion war jedoch nicht zu beobachten. Trotz der positiven Resultate im Mausmodell darf die präexistierende Immunität gegen die adenoviralen Vektoren im Menschen nicht unterschätzt werden.

Mithilfe des funktionalisierten CaP Nanopartikelsystems kann dieses Phänomen umgangen werden. In Anlehnung an den adenoviralen Immunisierungsansatz im FV-Mausmodell wurden CaP Nanopartikel zur Immunisierung eingesetzt, die mit

restringierten T-Zellepitopen aus GagL und gp70 sowie CpG funktionalisiert wurden. Wie die Immunisierung mit adenoviralen Vektoren führte die Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln zu einem signifikanten Anstieg Virus-spezifischer, IFN- γ -sezernierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die nach Belastungsinfektion sowohl die Entstehung der Infektions-vermittelten Splenomegalie verhindern als auch die Virusreplikation signifikant reduzieren. Die Effizienz dieses Ansatzes wurde nach Belastungsinfektion mit einer 5-fach höheren Virusdosis deutlich. Auch hier konnte eine signifikante Reduktion der Viruslast festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Induktion Virus-spezifischer T-Zellen für den Schutz gegen retrovirale Infektionen entscheidend sein kann. Untersuchungen zur HIV-Infektion untermauern diesen Befund. Es wurde demonstriert, dass CTL Antworten für die Kontrolle einer HIV-Infektion wichtig sind und damit das primäre Ziel der prophylaktischen Immunisierung darstellen (Belyakov *et al.* 1998; Ishii *et al.* 2012; Norris *et al.* 2001). Zusätzlich ist die Helferfunktion von Virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für die Aufrechterhaltung von CD8⁺ CTLs während der HIV-Infektion wichtig (Altfeld and Rosenberg 2000). Daher scheint die effektive Induktion Virus-spezifischer T-Zellen durch bewusst mit T-Zellpitopen funktionalisierten CaP Nanopartikeln ein vielversprechender Vakzinierungsansatz zu sein.

Neben der prophylaktischen Vakzinierung gegen HIV ist auch die Entwicklung neuer antiretroviraler therapeutischer Maßnahmen von Interesse, da für die Therapie einer etablierten HIV-Infektion bisher nur die Möglichkeit der „Highly Active Retroviral Therapy“ (HART) existiert. Dabei handelt es sich um eine medikamentöse Kombinationstherapie, die sich u.a. aus verschiedenen Hemmstoffen gegen virale Enzyme zusammensetzt. Sie ist aufgrund der hohen Kosten nur ca. 5 % der weltweit Infizierten zugänglich und vermittelt keine vollständige Heilung, sondern verzögert nur die Entwicklung von AIDS. Ein kostengünstiges System, das einfach herzustellen ist und noch dazu die T-Zellantwort stärkt, wäre eine gute Alternative.

Die unterschiedlichen Suszeptibilitäten verschiedener Labormausstämme erlaubt neben Untersuchungen zur akuten FV-Infektion, auch die Etablierung und Charaktisierung einer chronischen Infektion in resistenten C57BL/6 Mäusen. Die Behandlung chronisch FV-infizierter Mäuse mit CpG führt zur Reduktion des viralen Titers in der Milz (Kraft *et al.* 2007). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass

dieser Effekt erhöht werden kann, wenn chronisch infizierte Mäuse mit CpG/Peptid-funktionalisierten CaP Nanopartikeln behandelt werden. Es ist bekannt, dass es während einer chronischen Virusinfektion häufig zu Funktionsverlusten von Effektor T-Zellen kommt (Ciurea *et al.* 2001). Unter normalen Bedingungen werden nach Infektion Virus-spezifische CTLs aktiviert und sezernieren IFN- γ und Granzym B zur Pathogenabwehr (Zelinskyy *et al.* 2004). Während einer chronischen, retroviralen Infektion scheinen vor allem CD4⁺ regulatorische T-Zellen die Funktion von CTLs zu unterdrücken (Dietze *et al.* 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine einmalige Behandlung chronisch infizierter Mäuse mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln führt zur Reaktivierung IFN- γ - und Granzym B-produzierender Effektor-T-Zellen, während gleichzeitig die Anzahl CD4⁺ regulatorischer T-Zellen abnimmt. Trotz der positiven Ergebnisse ist bisher nicht geklärt, über welchen Mechanismus die Reaktivierung stattfindet. Im FV-Modell wurde Typ I Interferon- α (IFN- α) wirksam zur anti-retroviralen Therapie eingesetzt. Die direkte Injektion von IFN- α führt zur einer Reduktion der Viruslast (Bayer *et al.* 2011; Gerlach *et al.* 2009; Gibbert *et al.* 2010; Gibbert *et al.* 2012; Gibbert and Dittmer 2011). Auch in der anti-retroviralen HIV Therapie wurde IFN- α frühzeitig eingesetzt (DeVita, Jr. *et al.* 1987; Skidmore and Mawson 1987; Volberding *et al.* 1984). Verschiedene CpG-Sequenztypen können über Zellen des angeborenen Immunsystems die Sekretion von IFN- α induzieren (Gray *et al.* 2007; Krug *et al.* 2004). Dies könnte ein Mechanismus sein, wie es nach Applikation CpG-funktionalisierter Nanopartikel zu einer reduzierten Viruslast kommt. Um dies abschließend zu testen, könnte in zukünftigen Experimenten eine therapeutische Vakzinierung in mit FV-chronisch infizierten IFN- α Rezeptor KO Mäusen durchgeführt werden. Auch die Injektion des TLR3 Liganden poly(I:C) vermittelt die Sekretion von IFN- α und führt zu einer Reduktion des Virustiters (Gibbert *et al.* 2010). Daher wäre es ebenfalls sinnvoll, den therapeutischen Effekt von poly(I:C) funktionalisierten CaP Nanopartikeln auf die chronische Infektion zu testen. In den durchgeführten Experimenten wurden die chronisch infizierten Mäuse nur einmal immunisiert und nach 7 Tagen die Viruslast bestimmt. Unklar ist, ob diese Reduktion stabil ist oder die Viruslast wieder ansteigt. Zusätzlich könnte eine mehrmalige therapeutische Behandlung die Ergebnisse weiter verbessern. Insgesamt sind weitere Studien nötig, um den

Einsatz von funktionalisierten CaP Nanopartikeln als therapeutisches Vakzin zu untermauern.

Abschließend lassen sich die Erkenntnisse sicherlich nicht direkt auf eine HIV Infektion übertragen, da sich Friend und HI Virus in wichtigen Punkten wie der Morphologie und der Infektionspathogenese unterscheiden. Trotzdem tragen die generierten Ergebnisse zum besseren Verständnis einer retroviralen Infektion bei und erlauben Rückschlüsse für die Entwicklung von Vakzinen gegen HIV.

In der vorliegenden Arbeit wurde primär der Ansatz verfolgt virale Antigene und Adjuvantien durch die Verpackung in Nanopartikel gleichzeitig und effizient in DCs zu transportieren. Allerdings werden Nanopartikel nicht ausschließlich von DCs aufgenommen. Auch Makrophagen und Monozyten besitzen die Fähigkeit Nanopartikel verschiedener Arten aufzunehmen (Kelly *et al.* 2011; Owens, III and Peppas 2006). Eine Möglichkeit die Aufnahme von Nanopartikeln durch DCs zu erhöhen besteht in der spezifischen Adressierung von DCs durch DC-spezifische Antikörper, wie DEC205 oder DC-Sign. In einer Studie von Tacke *et al.* wurde das Antigen direkt an einen DC-spezifischen Antikörper gekoppelt, um so die Induktion einer Immunantwort zu verstärken (Tacke *et al.* 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die funktionalisierten CaP Nanopartikel so weiterentwickelt, dass Antikörper auf der Oberfläche gekoppelt werden können (Kozlova *et al.* 2011). Die Konjugation eines α CD11c Antikörpers erhöhte die Assoziation von CaP Nanopartikeln zu DCs *in vitro* und *in vivo* und damit wahrscheinlich auch deren Aufnahme (Kozlova *et al.* 2011). Da CD11c allerdings nicht als effektiver Endozytoserezeptor gilt, wurde dieser Funktionalisierungsansatz weiter vertieft. Einige Studien beschäftigten sich bereits mit der spezifischen Adressierung von Impfstoffen. Dabei sind oft von DCs exprimierte Endozytoserezeptoren das Ziel (Tacke *et al.* 2007). DEC205 ist einer dieser Rezeptoren und gehört zur Rezeptorfamilie der C-Typ Lectine. In der Maus wird er vor allem von CD8⁺ DCs exprimiert und die Aufnahme von Antigenen über DEC-205 kann zur Aktivierung des Immunsystems genutzt werden (Bozzacco *et al.* 2010; Gurer *et al.* 2008; Idoyaga *et al.* 2011), Kreutz *et al.* 2012). Durch die Eigenschaft der Kreuzpräsentation von CD8⁺ DCs ist diese Methode vor allem für die Aktivierung von CTLs sehr effektiv. Allerdings ist die gleichzeitige Applikation von Adjuvantien entscheidend, um die Induktion von Toleranz zu vermeiden (Bonifaz *et al.*

2002;Bonifaz *et al.* 2004). Ein besonderer Vorteil des CaP Nanopartikelsystems ist daher die gleichzeitige Aufnahme von TLR-Ligand und Antigen in eine DC, um die sichere Aktivierung der DC und die effiziente Präsentation des Antigens zu gewährleisten. In ersten Immunisierungsexperimenten mit α DEC205-konjugierten funktionalisierten CaP Nanopartikeln konnte die Induktion HA-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle weiter erhöht werden. Ob dies auch einen Einfluss auf den Schutz gegen die Influenza Infektion hat, muss allerdings noch in Belastungsexperimenten nach Immunisierung getestet werden. Kreutz *et al.* konnten mit einem nicht partikulären Ansatz bereits zeigen, dass die Verbindung von Antigen, Adjuvans und α DEC205 sehr gut für die prophylaktische Induktion anti-tumoraler CD8⁺ T-Zellantworten in der Maus eingesetzt werden können (Kreutz *et al.* 2012). Daher scheint der spezifische Transport von Vakzinen zu DCs ein vielversprechender Ansatz zur verbesserten Induktion effizienter Immunantworten zu sein. Die Methode der Antikörper-Funktionalisierung könnte jedoch noch weiter optimiert werden. Die Verwendung von Biotin-konjugierten Antikörpern könnte eine individuelle Funktionalisierung ermöglichen. Eine weitere, einfache Funktionalisierung durch den Anwender mit Streptavidin-konjugierten Antikörpern oder anderer Moleküle wäre vorstellbar und würde die Individualität dieses Systems unterstreichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Möglichkeit der flexiblen Zusammensetzung des CaP Nanopartikelsystems. Sowohl die verpackten Peptide als auch die Funktionalisierung mit TLR-Liganden sind flexibel wählbar. Besonders im humanen System ist dieser Ansatz interessant, da im Gegensatz zu den genetisch identischen Labormausstämmen das Immunsystem jedes Menschen durch die HLA-Allele individuell restringiert ist. Die individuelle Auswahl HLA restringierter Epitope kann so Rücksicht auf den jeweiligen HLA-Typ nehmen. Ein weiteres Phänomen stellen sogenannte Fluchtmutationen bei vielen Viren wie HIV oder dem Hepatitis C Virus dar. Diese treten aufgrund des immunologischen Drucks gegen das Virus auf und sind eng mit dem HLA Genotyp des Individuums verknüpft (International HIV Controllers Study *et al.* 2010;Ruhl *et al.* 2011). Vorstellbar wäre hier eine Immunisierung die diese Mutationsvorgänge berücksichtigt. Es könnten Epitope gewählt werden, die resistent gegen Mutationen sind oder bekannte Mutationen enthalten um so eine breitere Immunabwehr zu induzieren und den mutationsbedingten Vorsprung des Virus zu

minimieren. Individuell zusammengestellte CaP Nanopartikel Chargen, die HLA Genotyp sowie bekannte Virusmutationen berücksichtigen wären damit ein weiterer Vorteil dieses Nanopartikelsystems. Um die bereits erwähnten Probleme der HIV Forschung zu umgehen, scheint das humanisierte Mausmodell ein vielversprechender Ansatz zu sein. Durch Transplantation humaner hematopoetischer Stammzellen können Mäuse mit HIV-1 infiziert werden (Zhang and Su 2012). Das Modell würde sich eignen, um die Vakzinierung gegen HIV Infektion mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln zu testen. Dabei könnten T-Zellepitope aus den viralen Oberflächenproteinen gp120 und gp160 für die Funktionalisierung verwendet werden.

Zelluläre Immunantworten spielen aber nicht nur bei viralen Infektionen eine bedeutende Rolle, sondern sind auch für die anti-Tumor Immunologie von großer Wichtigkeit (Dezfouli *et al.* 2003; Hung *et al.* 1998; Wang 2001). Tumorzellen gehen nach verschiedenen genetischen Transformationen aus normalen Zellen hervor und exprimieren charakteristische Antigene, die vom Immunsystem erkannt werden können. Ähnlich wie bei der Vakzinierung gegen Pathogene ist bei der anti-tumoralen Immunisierung die Etablierung einer Tumor-spezifischen T-Zellantwort das Ziel. Die Induktion potenter CTLs spielt dabei aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften eine große Rolle. Daher ist die Adressierung kreuzpräsentierender DCs hier ebenfalls wichtig für die CTL vermittelte Immunität sind (Moriya *et al.* 2010; van den Broeke *et al.* 2003). In einem Melanom Modell in der Maus konnten De Geest *et al.* durch Verpacken eines Tumor-spezifischen Proteins in polymere Mikrokapseln potente anti-tumorale T-Zellantworten induzieren, die nach Transfer von Tumorzellen das Tumorwachstum kontrollierten und das Überleben der Mäuse sicherten (De Geest *et al.* 2012). Eine ähnliche Anwendung wäre auch unter Verwendung des CaP Nanopartikelsystems möglich. Eine Überlegung wäre dabei Tumorzelllysate für die Immunisierung zu verwenden. In einer früheren Studie konnte mit Hilfe von PLGA-Nanopartikeln gezeigt werden, dass sich auf diesem Weg effektive Tumor-spezifische CTLs induzieren lassen (Zhang *et al.* 2011).

Zusammenfassend konnte diese Arbeit das große Potential des CaP Nanopartikelsystems für die Induktion anti-viraler Immunantworten zeigen. Dabei wurde die Flexibilität dieses Systems ausgenutzt, CaP Nanopartikel gleichzeitig mit TLR-Liganden sowie viralen T-Zellepitopen auszustatten, um so das

angeborene Immunsystem zu aktivieren und nachweislich die Etablierung Virus-spezifischer Immunantworten zu verstärken. Die weitere Modifizierung der CaP Nanopartikel ergibt weitere Funktionalisierungsmöglichkeiten. Die Ummantelung mit einer PEI-Schicht wird neben der kovalenten Bindung Zell-spezifischer Antikörper in Zukunft auch die Möglichkeit für die Bindung oder Transport weiterer Moleküle ergeben. So könnten nicht nur Antigene sondern auch pro-inflammatorische Zytokine oder Cytostatika transportiert werden. Dadurch ergibt sich eine große Auswahl an Einsatzmöglichkeiten für dieses System, so dass es als ernsthafte Alternative für die Immuntherapie angesehen werden kann. Die Synthetisierung von CaP Nanopartikeln ist kostengünstig und zeitersparend. Um dieses System für die klinische Nutzung zugänglich zu machen, muss eine Gefriertrocknung der funktionalisierten CaP Nanopartikel etabliert werden.

5 Zusammenfassung

Die immunologischen Abwehrmechanismen gegen Infektionskrankheiten sind sehr komplex. Dabei sind die verschiedenen Bereiche des Immunsystems gegen die Infektion einzelner Pathogene unterschiedlich effektiv. Während neutralisierende Antikörper schützend gegen einige Virusinfektionen wirken, sind sie gegen andere, wie z.B. HIV Infektionen, nicht ausreichend. Dies ist unter anderem in der Morphologie und Pathologie des jeweiligen Virus begründet. Die Möglichkeit Pathogen-spezifische T-Zellantworten zu induzieren ist in solchen Fällen für neuartige Vakzine von besonderer Wichtigkeit. Nanopartikuläre Ansätze werden dabei als sehr effektive Immunisierungsvehikel angesehen. Die partikuläre Struktur der Nanopartikel, sowie die Funktionalisierung mit immunogenen Strukturen von Bakterien oder Viren, ergeben ein Pathogen-Mimikry, welches eine Pathogen-ähnliche Aktivierung des angeborenen Immunsystems und damit Initiierung einer Immunantwort erlaubt.

In dieser Arbeit wurde der Einsatz von biologisch abbaubaren Calciumphosphat (CaP) Nanopartikeln als Immunisierungsvehikel untersucht. CaP Nanopartikel wurden mit Toll-like Rezeptor (TLR)-Liganden CpG (TLR9) oder poly(I:C) (TLR3), sowie viralen Antigenen funktionalisiert und die schnelle Aufnahme dieser Nanopartikel durch Dendritische Zellen (DCs) gezeigt. Die Aufnahme der Nanopartikel *in vitro* führte zur Reifung der DCs und zur Induktion einer Virus-spezifischen T-Zell-Antwort.

Immunisierungsexperimente mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln gegen das Influenza Virus und das retrovirale Friend Virus zeigen deutlich, dass es zur Induktion Virus-spezifischer IFN- γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ Effektor T-Zellen kommt. Die anti-virale Funktion dieser Zellen wurde in anschließenden Infektionsexperimenten gezeigt. Sowohl die Influenza-Viruslast als auch die Friend-Viruslast konnte signifikant reduziert werden. Die erzielten Ergebnisse zeigen das Potential des neu entwickelten Nanopartikel-Systems für den Einsatz in der prophylaktischen Vakzinierung sehr deutlich. Einige virale Infektionen resultieren jedoch nicht in der vollständigen Klärung der Pathogene und können zu chronisch persistierenden Infektionen führen. Immunologische Toleranzmechanismen führen dabei oft zu Beeinträchtigung der Immunantwort. Deshalb ist hier die Reaktivierung der Pathogen-spezifischen Immunantwort eines

der wichtigen Ziele einer therapeutischen Immunisierung. Im chronischen FV-Mausmodell wurde demonstriert, dass die einmalige therapeutische Immunisierung mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast führt. Dabei scheint die Reaktivierung von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und die Reduktion regulatorischer T-Zellen einen wichtigen Beitrag zu leisten.

Zusammenfassend machen die Ergebnisse dieser Arbeit sehr deutlich, dass sich CaP Nanopartikel hervorragend als Immunisierungsvehikel eignen. Die umfangreichen Funktionalisierungsmöglichkeiten dieses Systems erlauben zusätzlich einen sehr flexiblen Einsatz dieser Nanopartikel gegen verschiedene akute und chronische Infektionen.

6 Literatur

- Abbas A K, Murphy K M, and Sher A 1996 Functional diversity of helper T lymphocytes; *Nature* **383** 787-793
- Aderem A and Underhill D M 1999 Mechanisms of phagocytosis in macrophages; *Annu. Rev. Immunol.* **17** 593-623
- Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O 2006 Pathogen recognition and innate immunity; *Cell* **124** 783-801
- Altfeld M and Rosenberg E S 2000 The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1; *Curr. Opin. Immunol.* **12** 375-380
- Amidi M, Romeijn S G, Verhoef J C, Junginger H E, Bungener L, Huckriede A, Crommelin D J, and Jiskoot W 2007 N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in a mouse model; *Vaccine* **25** 144-153
- Anderson R M, Donnelly C A, and Gupta S 1997 Vaccine design, evaluation, and community-based use for antigenically variable infectious agents; *Lancet* **350** 1466-1470
- Bal S M, Hortensius S, Ding Z, Jiskoot W, and Bouwstra J A 2011 Co-encapsulation of antigen and Toll-like receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination; *Vaccine* **29** 1045-1052
- Baltimore D 1970 RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses; *Nature* **226** 1209-1211
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y J, Pulendran B, and Palucka K 2000 Immunobiology of dendritic cells; *Annu. Rev. Immunol.* **18** 767-811
- Baron S 1996 *Medical Microbiology* (Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston)
- Baumgarth N and Kelso A 1996 In vivo blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue; *J. Virol.* **70** 4411-4418
- Bayer W, Lietz R, Ontikatz T, Johrden L, Tenbusch M, Nabi G, Schimmer S, Groitl P, Wolf H, Berry C M, Uberla K, Dittmer U, and Wildner O 2011 Improved vaccine protection against retrovirus infection after co-administration of adenoviral vectors encoding viral antigens and type I interferon subtypes; *Retrovirology*. **8** 75

- Bayer W, Tenbusch M, Lietz R, Johrden L, Schimmer S, Uberla K, Dittmer U, and Wildner O 2010 Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection; *J. Virol.* **84** 1967-1976
- Behrens G and Stoll M 2006 Pathogenesis and Immunology; in *Influenza Report* (eds) Kamps, Hoffmann, and Preiser
- Belyakov I M, Derby M A, Ahlers J D, Kelsall B L, Earl P, Moss B, Strober W, and Berzofsky J A 1998 Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95** 1709-1714
- Belz G T, Smith C M, Eichner D, Shortman K, Karupiah G, Carbone F R, and Heath W R 2004 Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses; *J. Immunol.* **172** 1996-2000
- Beutler B 2003 Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43** 609-628
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig M C, and Steinman R M 2002 Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance; *J. Exp. Med.* **196** 1627-1638
- Bonifaz L C, Bonnyay D P, Charalambous A, Darguste D I, Fujii S, Soares H, Brimnes M K, Molledo B, Moran T M, and Steinman R M 2004 In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination; *J. Exp. Med.* **199** 815-824
- Boscardin S B, Hafalla J C, Masilamani R F, Kamphorst A O, Zebroski H A, Rai U, Morrot A, Zavala F, Steinman R M, Nussenzweig R S, and Nussenzweig M C 2006 Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses; *J. Exp. Med.* **203** 599-606
- Bourquin C, Anz D, Zwioerek K, Lanz A L, Fuchs S, Weigel S, Wurzenberger C, von der B P, Golic M, Moder S, Winter G, Coester C, and Endres S 2008 Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity; *J. Immunol.* **181** 2990-2998
- Bouvier N M and Lowen A C 2010 Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission; *Viruses.* **2** 1530-1563

- Bouvier N M and Palese P 2008 The biology of influenza viruses; *Vaccine* **26 Suppl 4** D49-D53
- Bozzacco L, Trumpfheller C, Huang Y, Longhi M P, Shimeliovich I, Schauer J D, Park C G, and Steinman R M 2010 HIV gag protein is efficiently cross-presented when targeted with an antibody towards the DEC-205 receptor in Flt3 ligand-mobilized murine DC; *Eur. J. Immunol.* **40** 36-46
- Brown D M, Dilzer A M, Meents D L, and Swain S L 2006 CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch; *J. Immunol.* **177** 2888-2898
- Buchbinder S P, Mehrotra D V, Duerr A, Fitzgerald D W, Mogg R, Li D, Gilbert P B, Lama J R, Marmor M, del R C, McElrath M J, Casimiro D R, Gottesdiener K M, Chodakewitz J A, Corey L, and Robertson M N 2008 Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial; *Lancet* **372** 1881-1893
- Burgdorf S and Kurts C 2008 Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation; *Curr. Opin. Immunol.* **20** 89-95
- Byrd W, de L A, Zheng Z R, and Cassels F J 2005 Microencapsulated subunit vaccine approach to enterotoxigenic Escherichia coli and other mucosal pathogens; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** 1362-1380
- Chesebro B, Wehrly K, and Stimpfling J 1974 Host genetic control of recovery from Friend leukemia virus-induced splenomegaly: mapping of a gene within the major histocompatibility complex; *J. Exp. Med.* **140** 1457-1467
- Chikh G, de Jong S D, Sekirov L, Raney S G, Kazem M, Wilson K D, Cullis P R, Dutz J P, and Tam Y K 2009 Synthetic methylated CpG ODNs are potent in vivo adjuvants when delivered in liposomal nanoparticles; *Int. Immunol.* **21** 757-767
- Ciurea A, Hunziker L, Klenerman P, Hengartner H, and Zinkernagel R M 2001 Impairment of CD4(+) T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants; *J. Exp. Med.* **193** 297-305
- Coffin J M, Hughes S H, and Varmus H E 1997 *Retroviruses* (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Danhier F, Ansorena E, Silva J M, Coco R, Le B A, and Preat V 2012 PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications; *J. Control Release* **161** 505-522
- Darrah P A, Patel D T, De Luca P M, Lindsay R W, Davey D F, Flynn B J, Hoff S T, Andersen P, Reed S G, Morris S L, Roederer M, and Seder R A 2007

- Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*; *Nat. Med.* **13** 843-850
- De Geest B G, Willart M A, Hammad H, Lambrecht B N, Pollard C, Bogaert P, De F M, Saelens X, Vervaet C, Remon J P, Grooten J, and De K S 2012 Polymeric multilayer capsule-mediated vaccination induces protective immunity against cancer and viral infection; *ACS Nano.* **6** 2136-2149
- de B C, Tomkowiak M, Ghittoni R, Caux C, Leverrier Y, and Marvel J 2011 CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8alpha+ dendritic cells [corrected]; *J. Immunol.* **186** 1503-1511
- De K S, Naessens T, De Geest B G, Bogaert P, Demeester J, De S S, and Grooten J 2010 Biodegradable polyelectrolyte microcapsules: antigen delivery tools with Th17 skewing activity after pulmonary delivery; *J. Immunol.* **184** 203-211
- DeVita V T, Jr., Broder S, Fauci A S, Kovacs J A, and Chabner B A 1987 Developmental therapeutics and the acquired immunodeficiency syndrome; *Ann. Intern. Med.* **106** 568-581
- Dezfouli S, Hatzinisiriou I, and Ralph S J 2003 Enhancing CTL responses to melanoma cell vaccines in vivo: synergistic increases obtained using IFNgamma primed and IFNbeta treated B7-1+ B16-F10 melanoma cells; *Immunol. Cell Biol.* **81** 459-471
- Dietze K K, Zelinskyy G, Gibbert K, Schimmer S, Francois S, Myers L, Sparwasser T, Hasenkrug K J, and Dittmer U 2011 Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108** 2420-2425
- Dittmer U and Hasenkrug K J 2001 Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections; *Curr. Mol. Med.* **1** 431-436
- Dittmer U, He H, Messer R J, Schimmer S, Olbrich A R, Ohlen C, Greenberg P D, Stromnes I M, Iwashiro M, Sakaguchi S, Evans L H, Peterson K E, Yang G, and Hasenkrug K J 2004 Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection; *Immunity.* **20** 293-303
- Diwan M, Tafaghodi M, and Samuel J 2002 Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres; *J. Control Release* **85** 247-262
- Domingos-Pereira S, Decrausaz L, Derre L, Bobst M, Romero P, Schiller J T, Jichlinski P, and Nardelli-Haeffliger D 2012 Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice; *Mucosal. Immunol.*

- Dorozhkin S V and Eppele M 2002 Biological and medical significance of calcium phosphates; *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41** 3130-3146
- Dudziak D, Kamphorst A O, Heidkamp G F, Buchholz V R, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee H W, Park C G, Steinman R M, and Nussenzweig M C 2007 Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo; *Science* **315** 107-111
- Eppele M, Hard M, Nikolow S, Rheinberger H J, and Roelcke V 2010 *NTM.* **18** 269-274
- Foged C, Brodin B, Frokjaer S, and Sundblad A 2005 Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model; *Int. J. Pharm.* **298** 315-322
- Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, Bestebroer T M, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan G F, Olsen B, and Osterhaus A D 2005 Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls; *J. Virol.* **79** 2814-2822
- Fruh K and Yang Y 1999 Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma; *Curr. Opin. Immunol.* **11** 76-81
- Gerlach N, Gibbert K, Alter C, Nair S, Zelinskyy G, James C M, and Dittmer U 2009 Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo; *Eur. J. Immunol.* **39** 136-146
- Gibbert K, Dietze K K, Zelinskyy G, Lang K S, Barchet W, Kirschning C J, and Dittmer U 2010 Polyinosinic-polycytidylic acid treatment of Friend retrovirus-infected mice improves functional properties of virus-specific T cells and prevents virus-induced disease; *J. Immunol.* **185** 6179-6189
- Gibbert K and Dittmer U 2011 Distinct antiviral activities of IFN-alpha subtypes; *Immunotherapy.* **3** 813-816
- Gibbert K, Schlaak J, Yang D, and Dittmer U 2012 Interferon alpha subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy; *Br. J. Pharmacol.*
- Gong M, Zhou J, Yang C, Deng Y, Zhao G, Zhang Y, Wang Y, Zhou Y, Tan W, and Xu H 2012 Insect cell-expressed hemagglutinin with CpG oligodeoxynucleotides plus alum as an adjuvant is a potential pandemic influenza vaccine candidate; *Vaccine*
- Graf T 2008 Immunology: blood lines redrawn; *Nature* **452** 702-703
- Graham F L and van der Eb A J 1973 A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA; *Virology* **52** 456-467
- Gray R C, Kuchtey J, and Harding C V 2007 CpG-B ODNs potently induce low levels of IFN- α and induce IFN- α -dependent MHC-I cross-presentation in DCs as effectively as CpG-A and CpG-C ODNs; *J. Leukoc. Biol.* **81** 1075-1085

- Gregory S H and Wing E J 1993 IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes; *J. Immunol.* **151** 1401-1409
- Gurer C, Strowig T, Brilot F, Pack M, Trumpfheller C, Arrey F, Park C G, Steinman R M, and Munz C 2008 Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses; *Blood* **112** 1231-1239
- Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z, Elhasi S, Samuel J, and Lavasanifar A 2008 Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity; *Vaccine* **26** 5046-5057
- Hart D N 1997 Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response; *Blood* **90** 3245-3287
- Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, and Endres S 2003 Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells; *Eur. J. Immunol.* **33** 1633-1641
- Hasenkrug K J, Brooks D M, and Chesebro B 1995 Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92** 10492-10495
- Hasenkrug K J and Chesebro B 1997a Immunity to retroviral infection: the Friend virus model; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94** 7811-7816
- Heath W R, Belz G T, Behrens G M, Smith C M, Forehan S P, Parish I A, Davey G M, Wilson N S, Carbone F R, and Villadangos J A 2004 Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens; *Immunol. Rev.* **199** 9-26
- Heit A, Schmitz F, Haas T, Busch D H, and Wagner H 2007 Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity; *Eur. J. Immunol.* **37** 2063-2074
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, and Akira S 2000 A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA; *Nature* **408** 740-745
- Heuking S and Borchard G 2012 Toll-like receptor-7 agonist decoration enhances the adjuvanticity of chitosan-DNA nanoparticles; *J. Pharm. Sci.* **101** 1166-1177
- Hilleman M R 2002 Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control; *Vaccine* **20** 3068-3087
- Hoatlin M E and Kabat D 1995 Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia; *Trends Microbiol.* **3** 51-57

- Hom R C, Finberg R W, Mullaney S, and Ruprecht R M 1991 Protective cellular retroviral immunity requires both CD4+ and CD8+ immune T cells; *J. Virol.* **65** 220-224
- Homsy J, Meyer M, Tateno M, Clarkson S, and Levy J A 1989 The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells; *Science* **244** 1357-1360
- Horimoto T and Kawaoka Y 2005 Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents; *Nat. Rev. Microbiol.* **3** 591-600
- Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, and Levitsky H 1998 The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response; *J. Exp. Med.* **188** 2357-2368
- Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, Lahoud M H, Caminschi I, Huang Y, Rodriguez A, Clausen B E, Park C G, Trumfheller C, and Steinman R M 2011 Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108** 2384-2389
- International HIV Controllers Study, Pereyra F, McLaren P J, and Zhao M 2010 The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation; *Science* **330** 1551
- Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse T K, Kimura A, Takiguchi M, and Matano T 2012 Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques; *J. Virol.* **86** 738-745
- Jenner E 1789 An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, or Cow Pox; *The Harvard Classics*
- Jiang W, Gupta R K, Deshpande M C, and Schwendeman S P 2005 Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** 391-410
- Joshi M D, Unger W J, Storm G, van K Y, and Mastrobattista E 2012 Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers; *J. Control Release* **161** 25-37
- Kalkanidis M, Pietersz G A, Xiang S D, Mottram P L, Crimeen-Irwin B, Ardipradja K, and Plebanski M 2006 Methods for nano-particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity; *Methods* **40** 20-29
- Kanzler H, Barrat F J, Hessel E M, and Coffman R L 2007 Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists; *Nat. Med.* **13** 552-559

- Ke Y and Kapp J A 1996 Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake; *J. Exp. Med.* **184** 1179-1184
- Keene J A and Forman J 1982 Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes; *J. Exp. Med.* **155** 768-782
- Keijzer C, Slutter B, van der Zee R, Jiskoot W, van E W, and Broere F 2011 PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity; *PLoS. One.* **6** e26684
- Kelly C, Jefferies C, and Cryan S A 2011 Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages; *J. Drug Deliv.* **2011** 727241
- Kerkmann M, Lochmann D, Weyermann J, Marschner A, Poeck H, Wagner M, Battiany J, Zimmer A, Endres S, and Hartmann G 2006 Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles; *Oligonucleotides.* **16** 313-322
- Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, and von B H 1994 Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor; *J. Exp. Med.* **180** 25-34
- Klinman D M, Klaschik S, Sato T, and Tross D 2009 CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61** 248-255
- Kohlmeier J E and Woodland D L 2009 Immunity to respiratory viruses; *Annu. Rev. Immunol.* **27** 61-82
- Konig R, Huang L Y, and Germain R N 1992 MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8; *Nature* **356** 796-798
- Kozlova D, Chernousova S, Knuschke T, Buer J, Westendorf A M, and Epple M 2011 Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles; *Journal of Materials Chemistry*
- Kraft A R, Krux F, Schimmer S, Ohlen C, Greenberg P D, and Dittmer U 2007 CpG oligodeoxynucleotides allow for effective adoptive T-cell therapy in chronic retroviral infection; *Blood* **109** 2982-2984
- Kreutz M, Giquel B, Hu Q, Abuknesha R, Uematsu S, Akira S, Nestle F O, and Diebold S S 2012 Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial targeting specificity; *PLoS. One.* **7** e40208
- Krishnamachari Y and Salem A K 2009 Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61** 205-217

- Krug A, French A R, Barchet W, Fischer J A, Dzionek A, Pingel J T, Orihuela M M, Akira S, Yokoyama W M, and Colonna M 2004 TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function; *Immunity*. **21** 107-119
- Kurth R and Bannert N 2010 *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis* (Caister Academic Press)
- Kurts C, Robinson B W, and Knolle P A 2010 Cross-priming in health and disease; *Nat. Rev. Immunol.* **10** 403-414
- Lambrecht B N and Hammad H 2009 Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma; *Immunity*. **31** 412-424
- Lander M R and Chattopadhyay S K 1984 A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses; *J. Virol.* **52** 695-698
- Lawrence C W and Braciale T J 2004 Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8⁺ T cells during pulmonary influenza virus infection; *J. Immunol.* **173** 1209-1218
- Lawrence C W, Ream R M, and Braciale T J 2005 Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8⁺ T cells during primary pulmonary influenza virus infection; *J. Immunol.* **174** 5332-5340
- Legge K L and Braciale T J 2003 Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection; *Immunity*. **18** 265-277
- Leser G P and Lamb R A 2005 Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins; *Virology* **342** 215-227
- Li Z, Woo C J, Iglesias-Ussel M D, Ronai D, and Scharff M D 2004 The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination; *Genes Dev.* **18** 1-11
- Lillie P J, Berthoud T K, Powell T J, Lambe T, Mullarkey C, Spencer A J, Hamill M, Peng Y, Blais M E, Duncan C J, Sheehy S H, Havelock T, Faust S N, Williams R L, Gilbert A, Oxford J, Dong T, Hill A V, and Gilbert S C 2012 Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans; *Clin. Infect. Dis.* **55** 19-25
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren H G, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, and Knolle P A 2000 Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance; *Nat. Med.* **6** 1348-1354

- Maldonado-Lopez R, De S T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, and Moser M 1999 CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo; *J. Exp. Med.* **189** 587-592
- Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon T I, Bushkin Y, Davis D M, Strominger J L, Yewdell J W, and Porgador A 2001 Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells; *Nature* **409** 1055-1060
- Markel H 2005 The search for effective HIV vaccines; *N. Engl. J. Med.* **353** 753-757
- Marshall N B and Swain S L 2011 Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity; *J. Biomed. Biotechnol.* **2011** 954602
- McHeyzer-Williams L J, Malherbe L P, and McHeyzer-Williams M G 2006 Helper T cell-regulated B cell immunity; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311** 59-83
- McHutchison J G, Bacon B R, Gordon S C, Lawitz E, Shiffman M, Afdhal N H, Jacobson I M, Muir A, Al-Adhami M, Morris M L, Lekstrom-Himes J A, Efler S M, and Davis H L 2007 Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus; *Hepatology* **46** 1341-1349
- Meylan E, Tschopp J, and Karin M 2006 Intracellular pattern recognition receptors in the host response; *Nature* **442** 39-44
- Morgan D J, Liblau R, Scott B, Fleck S, McDevitt H O, Sarvetnick N, Lo D, and Sherman L A 1996 CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice; *J. Immunol.* **157** 978-983
- Moriya K, Wakabayashi A, Shimizu M, Tamura H, Dan K, and Takahashi H 2010 Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205(+) dendritic cells; *Cancer Immunol. Immunother.* **59** 1083-1095
- Mosmann T R and Coffman R L 1989 TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties; *Annu. Rev. Immunol.* **7** 145-173
- Mullbacher A, Lobigs M, Hla R T, Tran T, Stehle T, and Simon M M 2002 Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis; *J. Immunol.* **169** 145-150
- Muller U, Vogel P, Alber G, and Schaub G A 2008 The innate immune system of mammals and insects; *Contrib. Microbiol.* **15** 21-44
- Nagata S 1996 Fas-mediated apoptosis; *Adv. Exp. Med. Biol.* **406** 119-124

- Nayak D P, Hui E K, and Barman S 2004 Assembly and budding of influenza virus; *Virus Res.* **106** 147-165
- Neumann G and Kawaoka Y 2011 *Influenza Viruses: Molecular Virology* (John Wiley & Sons)
- Neumann S, Kovtun A, Dietzel I D, Eppele M, and Heumann R 2009 The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection; *Biomaterials* **30** 6794-6802
- Norris P J, Sumaroka M, Brander C, Moffett H F, Boswell S L, Nguyen T, Sykulev Y, Walker B D, and Rosenberg E S 2001 Multiple effector functions mediated by human immunodeficiency virus-specific CD4(+) T-cell clones; *J. Virol.* **75** 9771-9779
- Novembre F J, de R J, Nidtha S, O'Neil S P, Gibson T R, Evans-Strickfaden T, Hart C E, and McClure H M 2001 Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees; *J. Virol.* **75** 1533-1539
- O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller J L, Anders E M, Wu L, Lahoud M H, Henri S, Scott B, Hertzog P, Tatarczuch L, and Shortman K 2002 Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus; *J. Exp. Med.* **196** 1307-1319
- O'Neil S P, Novembre F J, Hill A B, Suwyn C, Hart C E, Evans-Strickfaden T, Anderson D C, deRosayro J, Herndon J G, Saucier M, and McClure H M 2000 Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees; *J. Infect. Dis.* **182** 1051-1062
- Owens D E, III and Peppas N A 2006 Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles; *Int. J. Pharm.* **307** 93-102
- Palladino G, Mozdzanowska K, Washko G, and Gerhard W 1995 Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice; *J. Virol.* **69** 2075-2081
- Patterson S, Papagatsias T, and Benlahrech A 2009 Use of adenovirus in vaccines for HIV; *Handb. Exp. Pharmacol.* 275-293
- Peterson K E, Iwashiro M, Hasenkrug K J, and Chesebro B 2000 Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4(+) and CD8(+) T cells important for recovery from friend retrovirus-induced leukemia; *J. Virol.* **74** 5363-5367
- Pozzi L A, Maciaszek J W, and Rock K L 2005 Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop

- effector function, and differentiate into memory cells; *J. Immunol.* **175** 2071-2081
- Renegar K B, Small P A, Jr., Boykins L G, and Wright P F 2004 Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract; *J. Immunol.* **173** 1978-1986
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prem Sri N, Namwat C, de S M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil J G, Francis D P, Stablein D, Bix D L, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb M L, Michael N L, Kunasol P, and Kim J H 2009 Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand; *N. Engl. J. Med.* **361** 2209-2220
- Robbins M A and Rossi J J 2005 Sensing the danger in RNA; *Nat. Med.* **11** 250-251
- Ruhl M, Knuschke T, Schewior K, Glavinic L, Neumann-Haefelin C, Chang D I, Klein M, Heinemann F M, Tenckhoff H, Wiese M, Horn P A, Viazov S, Spengler U, Roggendorf M, Scherbaum N, Nattermann J, Hoffmann D, and Timm J 2011 CD8+ T-cell response promotes evolution of hepatitis C virus nonstructural proteins; *Gastroenterology* **140** 2064-2073
- Russell J H and Ley T J 2002 Lymphocyte-mediated cytotoxicity; *Annu. Rev. Immunol.* **20** 323-370
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, and Ono M 2008 Regulatory T cells and immune tolerance; *Cell* **133** 775-787
- Savina A and Amigorena S 2007 Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells; *Immunol. Rev.* **219** 143-156
- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura I C, Lennon-Dumenil A M, Seabra M C, Raposo G, and Amigorena S 2006 NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells; *Cell* **126** 205-218
- Schulz O, Diebold S S, Chen M, Naslund T I, Nolte M A, Alexopoulou L, Azuma Y T, Flavell R A, Liljestrom P, and Reis e Sousa 2005 Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells; *Nature* **433** 887-892
- Seder R A and Paul W E 1994 Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells; *Annu. Rev. Immunol.* **12** 635-673
- Shortman K and Liu Y J 2002 Mouse and human dendritic cell subtypes; *Nat. Rev. Immunol.* **2** 151-161
- Skidmore S J and Mawson S J 1987 alpha-Interferon in anti-HIV positive patients; *Lancet* **2** 520
- Slutter B, Bal S, Keijzer C, Mallants R, Hagenaars N, Que I, Kaijzel E, van E W, Augustijns P, Lowik C, Bouwstra J, Broere F, and Jiskoot W 2010 Nasal

- vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen; *Vaccine* **28** 6282-6291
- Sokolova V, Knuschke T, Kovtun A, Buer J, Eppele M, and Westendorf A M 2010 The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation; *Biomaterials* **31** 5627-5633
- Sokolova V, Kovtun A, Heumann R, and Eppele M 2007 Tracking the pathway of calcium phosphate/DNA nanoparticles during cell transfection by incorporation of red-fluorescing tetramethylrhodamine isothiocyanate-bovine serum albumin into these nanoparticles; *J. Biol. Inorg. Chem.* **12** 174-179
- Sokolova V, Rotan O, Klesing J N P, Knuschke T, and Westendorf A M E M 2012 Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes; *J. Nanopart. Res.*
- Song J M, Van R N, Bozja J, Compans R W, and Kang S M 2011 Vaccination inducing broad and improved cross protection against multiple subtypes of influenza A virus; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108** 757-761
- Spencer T E and Palmarini M 2012 Application of next generation sequencing in mammalian embryogenomics: lessons learned from endogenous betaretroviruses of sheep; *Anim Reprod. Sci.* **134** 95-103
- Steinhauer D A 1999 Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus; *Virology* **258** 1-20
- Steinman R M and Hemmi H 2006 Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311** 17-58
- Steinman R M and Inaba K 1999 Myeloid dendritic cells; *J. Leukoc. Biol.* **66** 205-208
- Stevens T L, Bossie A, Sanders V M, Fernandez-Botran R, Coffman R L, Mosmann T R, and Vitetta E S 1988 Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells; *Nature* **334** 255-258
- Suzuki Y, Wakita D, Chamoto K, Narita Y, Tsuji T, Takeshima T, Gyobu H, Kawarada Y, Kondo S, Akira S, Katoh H, Ikeda H, and Nishimura T 2004 Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity; *Cancer Res.* **64** 8754-8760
- Swanson J A and Watts C 1995 Macropinocytosis; *Trends Cell Biol.* **5** 424-428
- Swiggard W J, Mirza A, Nussenzweig M C, and Steinman R M 1995 DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification,

- characterization, and N-terminal amino acid sequence; *Cell Immunol.* **165** 302-311
- Tacke P J, de Vries I J, Torensma R, and Figdor C G 2007 Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting; *Nat. Rev. Immunol.* **7** 790-802
- Tai W, Roberts L, Seryshev A, Gubatan J M, Bland C S, Zabriskie R, Kulkarni S, Soong L, Mbawuikie I, Gilbert B, Kheradmand F, and Corry D B 2011 Multistrain influenza protection induced by a nanoparticulate mucosal immunotherapeutic; *Mucosal. Immunol.* **4** 197-207
- Takeda A, Tuazon C U, and Ennis F A 1988 Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry; *Science* **242** 580-583
- Takeuchi O and Akira S 2010 Pattern recognition receptors and inflammation; *Cell* **140** 805-820
- Treanor J J, Mandell G L, Bennett J E, and Dolin R 2005 Influenza virus; in *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Churchill Livingstone) p 2060
- van den Broeke L T, Daschbach E, Thomas E K, Andringa G, and Berzofsky J A 2003 Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity; *J. Immunol.* **171** 5842-5852
- Vellozzi C, Burwen D R, Dobardzic A, Ball R, Walton K, and Haber P 2009 Safety of trivalent inactivated influenza vaccines in adults: background for pandemic influenza vaccine safety monitoring; *Vaccine* **27** 2114-2120
- Verthelyi D and Zeuner R A 2003 Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9; *Trends Immunol.* **24** 519-522
- Villadangos J A, Driessen C, Shi G P, Chapman H A, and Ploegh H L 2000 Early endosomal maturation of MHC class II molecules independently of cysteine proteases and H-2DM; *EMBO J.* **19** 882-891
- Volberding P, Valero R, Rothman J, and Gee G 1984 Alpha interferon therapy of Kaposi's sarcoma in AIDS; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **437** 439-446
- Waibel K H and Gomez R 2010 Ovalbumin content in 2009 to 2010 seasonal and H1N1 monovalent influenza vaccines; *J. Allergy Clin. Immunol.* **125** 749-51, 751
- Wang R F 2001 The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity; *Trends Immunol.* **22** 269-276
- Weaver C T, Harrington L E, Mangan P R, Gavrieli M, and Murphy K M 2006 Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties; *Immunity.* **24** 677-688
- Weiss I D, Wald O, Wald H, Beider K, Abraham M, Galun E, Nagler A, and Peled A 2010 IFN-gamma treatment at early stages of influenza virus infection

- protects mice from death in a NK cell-dependent manner; *J. Interferon Cytokine Res.* **30** 439-449
- Williams A, Peh C A, and Elliott T 2002 The cell biology of MHC class I antigen presentation; *Tissue Antigens* **59** 3-17
- Woodland D L 2003 Cell-mediated immunity to respiratory virus infections; *Curr. Opin. Immunol.* **15** 430-435
- Woodland D L and Randall T D 2004 Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract; *Semin. Immunol.* **16** 163-170
- Woodland D L and Scott I 2005 T cell memory in the lung airways; *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2** 126-131
- Wright P F and Webster R G 2001 Orthomyxoviruses; in *Editorial Fields Virology* (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins) p 1533
- Wyatt R and Sodroski J 1998 The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens; *Science* **280** 1884-1888
- Yang Z Y, Wei C J, Kong W P, Wu L, Xu L, Smith D F, and Nabel G J 2007 Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity; *Science* **317** 825-828
- Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C, and Dow S 2006 Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes; *J. Immunol.* **176** 7335-7345
- Zelinskyy G, Balkow S, Schimmer S, Schepers K, Simon M M, and Dittmer U 2004 Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection; *Virology* **330** 365-374
- Zhang L and Su L 2012 HIV-1 immunopathogenesis in humanized mouse models; *Cell Mol. Immunol.* **9** 237-244
- Zhang Z, Tongchusak S, Mizukami Y, Kang Y J, Ioji T, Touma M, Reinhold B, Keskin D B, Reinherz E L, and Sasada T 2011 Induction of anti-tumor cytotoxic T cell responses through PLGA-nanoparticle mediated antigen delivery; *Biomaterials* **32** 3666-3678
- Zolnik B S, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N, and Dobrovolskaia M A 2010 Nanoparticles and the immune system; *Endocrinology* **151** 458-465
- Zwioerek K, Bourquin C, Battiany J, Winter G, Endres S, Hartmann G, and Coester C 2008 Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides; *Pharm. Res.* **25** 551-562

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ag	Antigen
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom, engl. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle, engl. <i>antigen presenting cell</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaP	Calciumphosphat
CCR	engl. <i>C-C motif receptor</i>
CD	Differenzierungs-cluster, engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDC	konventionelle Dendritische Zelle, engl. <i>conventional dendritic cell</i>
CpG	unmethylierte 2'Dioxi-ribo Cytidin-Phosphat-Guanosin DNA Muster
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt, engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CXCR	engl. <i>C-X-C motif receptor</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonucleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DC	Dendritische Zelle, engl. <i>dendritic cell</i>
DEC205	Ly75, engl. <i>lymphocyte antigen 75</i>
Dnase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
env	Virushülle, engl. <i>envelope</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera, lat. <i>und andere</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
F-MuLV	Friend Murines Leukämievirus, engl. <i>Friend murine leukemia virus</i>
FV	Friend Virus
g	Gramm
gag	Gruppenspezifische Antigene
gp	Glykoprotein

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hemagglutinin
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
IC	engl. <i>infectious center</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	intranasal
IP	intraperitoneal
IV	intravenös
kb	Kilobase
KO	Knockout
l	Liter
LTR	engl. <i>Long terminal repeats</i>
μ	mikro
m	milli
M	Molar
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MACS	magnetische Zellseparation, engl. <i>magnetic cell separation</i>
MCMV	murines Cytomegalie Virus
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität, engl. <i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Klasse I- oder II- Moleküle, engl. <i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
myD88	engl. <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	Neuraminidase
NFκB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürlichen Killerzellen
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor
nm	Nanometer

NOD	engl. <i>nucleotide binding oligomerization domain</i>
NP	Nukleoprotein
NS	Nicht Strukturprotein
ODN	Oligodinucleotide
PA	RNA Polymerase
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster, engl. <i>pathogen associated molecular pattern</i>
PB	Polymerase-bindendes Protein
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plasmacytoide Dendritische Zelle
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negative dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration, lateinisch <i>potentia Hydrogenii</i>)
PLGA	engl. <i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
<i>pol</i>	Polymerase
poly(I:C)	engl. <i>polyinosinic polycytidylic acid</i>
<i>pro</i>	Protease
PRR	Mustererkennende Rezeptoren, engl. <i>pattern recognition receptors</i>
PTO	Phosphorothioat Oligonukleotide
RIG	engl. <i>retinoic acid inducible gene</i>
RLH	RNA Helikasen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SC	subcutan
SFFU	engl. <i>spleen focus forming units</i>
SFFV	engl. <i>spleen focus forming virus</i>
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
ss	einzelsträngig, engl. <i>single stranded</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, engl. <i>T cell receptor</i>
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor β</i>
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor, engl. <i>toll like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TRIF	engl. <i>Toll-Interleukin 1-Resistance (TIR) domain containing adaptor inducing IFN-β</i>

Upm	Umdrehungen pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>World Health Organisation</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Exogene und endogene Mechanismen zur Aufnahme und Präsentation von Antigenen	3
Abbildung 1.2	Vereinfachte Darstellung der Lokalisation und Signalwege der verschiedenen Toll-like Rezeptoren	7
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Influenza A Viruspartikels	15
Abbildung 1.4	Replikationszyklus von Influenza A Viren	17
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung des Aufbaus von Retroviren	20
Abbildung 1.6	Replikationszyklus von Retroviren	21
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung des Herstellungs- und Funktionalisierungsprozesses von mehrschaligen CaP Nanopartikeln funktionalisiert mit TLR-Liganden und HA-Peptid	45
Abbildung 3.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen mehrschaliger funktionalisierter Nanopartikel	46
Abbildung 3.3	Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel durch DCs	47
Abbildung 3.4	DC Reifung nach Stimulation mit funktionalisierten CaP Nanopartikeln	49
Abbildung 3.5	Aufnahme von CaP Nanopartikeln und Reifung von DCs	50
Abbildung 3.6	Induktion von DC Reifung wird durch den TLR-Ligand CpG in funktionalisierten CaP Nanopartikeln vermittelt	51
Abbildung 3.7	Keine Induktion von DC Reifung in TLR KO Mäusen durch CpG funktionalisierte CaP Nanopartikel	51
Abbildung 3.8	Induktion einer T-Zellantwort durch CaP Nanopartikel stimulierte DCs	53
Abbildung 3.9	Induktion einer CD8 ⁺ T-Zellantwort durch CaP Nanopartikel aktivierte DCs	55
Abbildung 3.10	<i>In vivo</i> Aufnahme von funktionalisierten CaP Nanopartikeln durch APC über verschiedene Applikationswege	56
Abbildung 3.11	Induktion Ag-spezifischer T-Zellantworten <i>in vivo</i>	58

Abbildung 3.12	IP Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion	60
Abbildung 3.13	Virustiter und CD8 ⁺ T-Zellantwort nach Infektion	61
Abbildung 3.14	IN Immunisierung gegen eine Influenza A/PR/8 H1N1 Infektion	62
Abbildung 4.15	Influenzainfektion nach IN Immunisierung	64
Abbildung 4.16	Aufnahme funktionalisierter CaP Nanopartikel durch DCs nach SC Injektion	65
Abbildung 3.17	SC Immunisierung gegen die retrovirale Friend Virus Infektion	67
Abbildung 3.18	Friend Virus Infektion nach Immunisierung	68
Abbildung 3.19	Friend Virus Infektion nach Immunisierung	70
Abbildung 3.20	T-Zell Charakterisierung nach therapeutischer Behandlung einer chronischen Friend Virus Infektion	73
Abbildung 3.21	Effekt der therapeutischen Behandlung einer chronischen Friend Virus Infektion auf die Viruslast	74
Abbildung 3.22	Funktionalisierung von CaP Nanopartikeln mit Antikörpermolekülen	76
Abbildung 3.23	In vivo Anwendung Antikörper-funktionalisierter CaP Nanopartikel	77
Abbildung 3.24	Induktion einer Influenza Virus-spezifischen T-Zellantwort mit α DEC205 funktionalisierten CaP Nanopartikeln	79

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	6
Tabelle 2.1	Oligonukleotidprimerpaare zur Identifizierung transgener Mäuse	28
Tabelle 2.2	PCR-Programm für die Identifikation transgener Mäuse	28
Tabelle 2.3	Standardreaktionsansatz einer PCR-Reaktion	29
Tabelle 2.4	Antikörperkonjugate für die Durchflusszytometrie	38
Tabelle 3.1	Größenanalyse der verschiedenen mehrschaligen CaP Nanopartikeln	46

Danksagung

In der Online-Version nicht enthalten.

Publikationen und Tagungsbeiträge

In der Online-Version nicht enthalten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht in der Online-Version enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Etablierung und Charakterisierung von biodegradierbaren Calciumphosphat Nanopartikeln zur Induktion potenter anti-viraler T-Zellantworten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Torben Knuschke befürworte.

Essen, den _____

Astrid Westendorf

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Torben Knuschke

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Torben Knuschke

